

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 803 747

②1 N° d'enregistrement national : 00 00573

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : A 61 K 7/48, A 61 K 7/06, 35/78, 31/353, A 61 P 17/08,  
17/14, 17/10

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 18.01.00.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 20.07.01 Bulletin 01/29.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : LABORATOIRES PHARMASCIENCE  
Société anonyme — FR.

⑦2 Inventeur(s) : MSIKA PHILIPPE et PICCIRILLI  
ANTOINE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 UTILISATION D'ISOFLAVONES ET/OU D'EXTRAITS DE PRUNIER D'AFRIQUE EN PHARMACIE,  
COSMETIQUE ET EN TANT QU'ADDITIF ALIMENTAIRE.

⑤7 La présente invention se rapporte à l'utilisation d'au  
moins un produit choisi dans le groupe constitué par les iso-  
flavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de  
ces derniers, pour la préparation d'une composition desti-  
née à inhiber l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase. Cette utilisation  
permet d'obtenir un effet remarquable d'inhibition de l'acti-  
vité de la 5 $\alpha$ -réductase procurant ainsi une nouvelle réponse  
pour le traitement des pathologies et/ ou désordres derma-  
tologiques liés à une exagération congénitale ou acqui-  
se de l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase, notamment pour le  
traitement de l'hypertrophie prostatique, de l'adénome pro-  
statique, de l'acné, de l'hyperséborrhée, de l'alopécie et de  
l'hirsutisme. L'invention se rapporte également à des mé-  
thodes de traitement cosmétique, notamment de la peau  
grasse, ainsi qu'à l'utilisation dudit produits décrits en tant  
qu'additifs dans un aliment pour l'être humain et/ ou l'ani-  
mal.

FR 2 803 747 - A1



5 La présente invention se rapporte à l'utilisation d'au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase, notamment pour le traitement de l'hypertrophie prostatique, de l'adénome prostatique, de l'acné, de l'hyperséborrhée, de l'alopecie, 10 de l'hirsutisme.

L'invention se rapporte également à des méthodes de traitement cosmétique, notamment de la peau grasse, ainsi qu'à l'utilisation des produits décrits en tant qu'additifs dans un aliment pour l'être humain et/ou l'animal.

15 La 5 $\alpha$ -réductase est une enzyme microsomiale NADPH dépendante qui existe sous forme de deux isoenzymes synthétisées à partir de deux gènes différents.

L'isoenzyme de type 1 de la 5 $\alpha$ -réductase est retrouvée essentiellement dans le foie et la peau, plus particulièrement dans les glandes sébacées de la peau non génitale et du cuir chevelu, et apparaît à la puberté. L'isoenzyme de type 2 est prédominante dans la prostate et au niveau de la peau des territoires sexuels 20 différenciés : région génitale, barbe, et joue un rôle dans la différenciation sexuelle. La répartition des isoenzymes de type 1 et 2 de la 5 $\alpha$ -réductase au niveau de la peau et des annexes cutanées chez l'homme peut être illustrée par le tableau 1 ci-après.

Il existe un certain nombre de pathologies pour lesquelles une exagération congénitale ou acquise de l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase est responsable en totalité ou 25 en majorité des troubles observés.

Par exemple, chez l'homme, cette enzyme 5 $\alpha$ -réductase, principalement localisée dans les tissus génitaux et dans la peau, catalyse l'hydroxylation de la testostérone en 5 $\alpha$ -réductase dihydrotestostérone (DHT). Or, comme la DHT est un androgène bien plus actif que la testostérone (environ 2 fois plus), les effets de cette 30 dernière sont amplifiés dans les tissus où est produite la DHT. Une activité trop élevée de la 5 $\alpha$ -réductase provoque ainsi des teneurs en androgène sous forme de

DHI trop élevées dans la prostate, d'où une surstimulation de cette dernière se traduisant en une croissance indésirable pouvant mener à la pathologie de l'hypertrophie prostatique, voire à l'adénome prostatique, nécessitant le plus souvent une intervention chirurgicale.

5

**Tableau 1 : répartition des isoenzymes de type 1 et 2 de la 5 $\alpha$ -réductase au niveau de la peau et des annexes cutanées chez l'homme**

		H5- $\alpha$ r1	H5- $\alpha$ r2
EPIDERMIE	Couche basale	++	+
	Couche spinuse	+	++
	Couche granuleuse	+	-
	Couche cornée	-	-
DERMIE	Fibroblastes	++	-
GLANDES SEBACEES	Cellules basales	++	+
	Cellules glandulaires	++	-
GLANDES SUDORALES ECCRINES	Canal excréteur	-	-
	Cellules sécrétrices	++	-
	Cellules myoépithéliales	++	+
FOLLICULE PILEUX	Papille dermique	+	+ ?
	Cellules de la matrice	++	+
	Gaine épithéliale interne	±	+++
	Gaine épithéliale externe	++	-
	Muscle arrecteur	+	-

D'autres pathologies, de type dermatologique, peuvent être observées chez l'homme ou la femme comme résultant d'une suractivité de la 5 $\alpha$ -réductase à savoir, en particulier l'acné, l'hirsutisme ou encore l'alopecie.

Dans la peau, l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase est plus importante dans la glande sébacée que dans les autres structures. Par ailleurs, les glandes séborrhéiques montrent une activité 5 $\alpha$ -réductase plus importante que celles des autres territoires

cutanés. Par conséquent, le niveau de sécrétion sébacée physiologique semble étroitement lié à l'activité de cette enzyme.

Chez l'acnéique, il existe une hyperactivité de la  $5\alpha$ -réductase. Plus qu'une augmentation des taux sériques des androgènes, c'est une augmentation des précurseurs en DHT, facteur principal de la fonction sébacée, qui participent à l'acné.

La peau grasse ou (séborrhée), outre son aspect disgracieux, constitue un terrain sur lequel peuvent survenir des complications. Elle atteint les zones où les glandes sébacées sont nombreuses et résulte principalement d'une surstimulation androgénique de la production sébacée par ces glandes spécifiques. L'hyper-séborrhée participe à la survenue des lésions d'acné vulgaire.

Dans le cuir chevelu, on retrouve l'isoenzyme de type 1 de la  $5\alpha$ -réductase au niveau des glandes sébacées, ainsi qu'au niveau du follicule pileux. L'isoenzyme de type 2 de la  $5\alpha$ -réductase est localisée majoritairement au niveau de la gaine épithéliale interne, ainsi qu'au niveau de la papille dermique du cheveu. Cependant cette dernière localisation reste à préciser.

L'alopecie androgénique, dont la physiopathogénie est très voisine de celle de l'acné, est la plus fréquente des alopecies et sans doute celle où la demande de thérapeutique est la plus forte. La  $5\alpha$ -réductase semble jouer un rôle primordial dans cette pathologie. En effet, les hommes atteints d'un déficit génétique en isoenzyme de type 2 de la  $5\alpha$ -réductase ne développent pas d'alopecie androgénétique.

Compte tenu de ce qui précède, la recherche s'est orientée vers la mise au point d'inhibiteurs de la  $5\alpha$ -réductase. Certains stéroïdes comme la progestérone ont été testés dans ce sens, mais sa métabolisation rapide la rend inefficace *in vivo*. Pour être actif, l'inhibiteur de  $5\alpha$ -réductase doit être suffisamment stable pour bloquer l'activité de l'enzyme *in vitro*. Le finastéride, inhibiteur compétitif stéroïdien, rempli cette condition, mais il est plus actif sur l'isoenzyme de type 2 que sur l'isoenzyme de type 1 et ces deux isoenzymes n'ont que 50 % d'homologie sur la séquence de leurs acides aminés. C'est donc surtout dans l'hyperplasie bénigne de la prostate que le finastéride a déjà été testé.

Par ailleurs, on connaît également l'extrait de *Serenoa Repens*, comme référence en tant qu'inhibiteur de la  $5\alpha$ -réductase, l'extrait de *Serenoa Repens*

présentant l'avantage, par rapport au finastéride, d'une origine naturelle en tant qu'extrait végétal permettant une meilleure comparaison pour des produits testés également d'origine naturelle. *Serenoa Repens*, également connu sous la dénomination *Sabal serrulatum*, est un petit palmier que l'on peut trouver aux Etats-  
5 Unis (Floride) en Afrique du Nord et en Espagne.

On a maintenant trouvé de manière tout à fait surprenante et inattendue que l'utilisation de certains composés d'origine végétale permet d'obtenir un effet remarquable d'inhibition de l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase procurant ainsi notamment une nouvelle réponse pour le traitement des pathologies et/ou désordres  
10 dermatologiques évoqués ci-dessus.

La présente invention se rapporte ainsi à l'utilisation d'au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase.

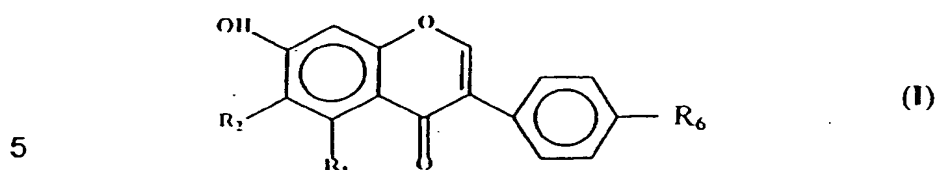
15 Selon l'invention, l'expression "et les mélanges de ces derniers" ci-dessus englobe bien entendu en particulier des mélanges d'isoflavones, des mélanges d'extraits de prunier d'Afrique ou encore des mélanges d'isoflavones(s) et d'extrait(s) de prunier d'Afrique.

En particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la  
20 composition est destinée à inhiber l'isoenzyme de type 1 et/ou l'isoenzyme de type 2 de la 5 $\alpha$ -réductase.

Les isoflavones utilisables selon l'invention peuvent être obtenues par synthèse chimique ou sont des substances naturelles extraites de produits naturels, notamment à partir des végétaux.

25 On distingue les formes aglycones des isoflavones et les formes glycosylées de ces dernières. Ces diverses formes sont illustrées par les formules suivantes.

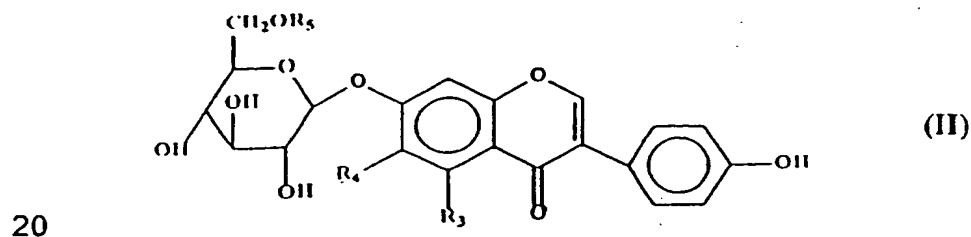
Formes aglycones, de formule :



dans laquelle R1 et R2 représentent :

	R1	R2	R6	Nom du composé
	H	H	OH	Daidzeine
10	OH	H	OH	Genisteine
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	Glyciteine
	H	H	OCH <sub>3</sub>	Formononectine
	OH	H	OCH <sub>3</sub>	Biochanine A

15 Formes glycosylées, de formule :



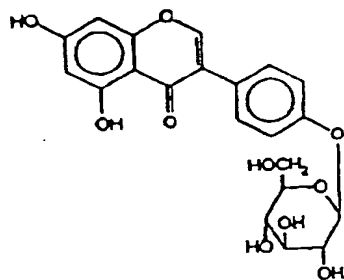
dans laquelle R3, R4 et R5 représentent :

	R3	R4	R5	Nom du composé
	H	H	H	Daidzine
	OH	H	H	Genistine
25	H	OCH <sub>3</sub>	H	Glycitine
	H	H	COCH <sub>3</sub>	Acetyldaidzine
	OH	H	COCH <sub>3</sub>	Acetylgenistine
	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	Acetylglycitine
	H	H	COCH <sub>2</sub> COOH	Malonyldaidzine
30	OH	H	COCH <sub>2</sub> COOH	Malonylgenistine
	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> COOH	Malonylglycitine

On peut encore citer :

- la génistéïn-4'-O-glucoside de formule :

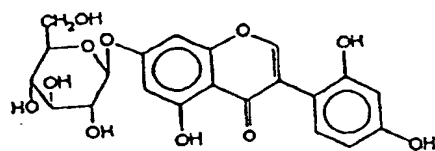
5



(III)

- la 2'-hydroxygénistéïn-7-O-glucoside de formule :

10

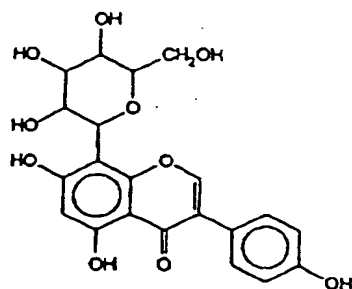


(IV)

15

- la génistéïn-C-8-glucoside de formule :

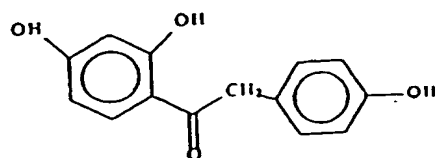
20



(V)

- la 2, 4, 4'-trihydroxydeoxybenzoïne (THB) de formule :

25



(VI)

30



Les formes glycosylées des isoflavones sont hydrolysées sous l'action des bêta-glucosidases. Les formes glycosylées (daidzine et génistine) et acylées sont les plus abondantes. Une hydrolyse acide chimique ou enzymatique peut transformer ces formes conjuguées en daidzéine et genistéine, plus absorbables.

- 5 L'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les isoflavones synthétiques ou d'origine naturelles, du groupe constitué par les génistine, daidzine, glycitine, acétyldaidzine, acétylgenistine, acétylglycitine, malonyldaidzine, malonylgénistine, malonylglycitine, la 2,4,4'-trihydroxydeoxybenzoïne (THB), la daidzéine, la génistéine, la glycitéine, la  
10 formononectine, la biochanine A, la génistéin-4'-O-glucoside, la 2'-hydroxygénistéin-7-O-glucoside, la génistéin-C-8-glucoside, et les mélanges de ces derniers.

On préfère tout particulièrement utiliser selon l'invention un produit choisi dans le groupe constitué par la génistine, la génistéine et les mélanges de ces derniers.

- 15 On ne connaît pas de sources naturelles aussi riches en isoflavones que le soja. Les méthodes de purification des isoflavones à partir de produits du soja, notamment les graines, les germes de soja (ou "soja germé"), les laits de soja dont broyats et mélasses et les produits fermentés (en particulier Tofu et Tempeh) sont bien connues de l'homme du métier.

- 20 Le tableau 2 suivant illustre les teneurs en isoflavones (microgrammes/gramme) dans des graines de soja de récoltes de l'Iowa (Wang et Murphy, "Isoflavone composition of American and Japanese Soybeans in Iowa : effects of variety, crop year, and location", J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 1674-1677).

25

**Tableau 2 : exemple de teneurs en isoflavones dans des graines de soja**

Formes aglycones	µg/g d'extrait sec.
Daidzeine	7-60
Genisteine	17-56
Glyciteine	20-24
Formes glycosylées	
Daidzine	180-780
Genistine	325-850
Glycitine	53-70
6"-O-malonyldaidzine	121-410
6"-O-malonylgenistine	290-958
6"-O-malonylglycitine	61-72
6"-O-acetyldaidzine	tr
6"-O-acetylgenistin	2-10
6"-O-acetylglycitine	23-36

Le soja germé est la source de soja la plus riche en isoflavones.

- Concernant le lait de soja, il est traditionnellement obtenu à chaud par
- 5 broyage des graines après dépelliculage, en milieu alcalin. Un traitement thermique est effectué pour inhiber les facteurs antitrypsiques.

Les quantités d'isoflavones présentes dans les laits de soja sont variables. Le tableau 3 suivant est une illustration des teneurs en isoflavones des laits de soja.

**Tableau 3 : exemple de teneurs en isoflavones dans des laits de soja**

Formes aglycones	$\mu\text{g/g}$ d'extrait sec.	mg/l de soja
Daidzeine	18	1,4
Genisteine	19	1,5
Glyciteine	10	0,8
Formes glycosylées		
Daidzine	410	33
Genistine	710	57
Glycitine	65	5
6"-O-malonyldaidzine	690	55
6"-O-malonylgenistine	871	70
6"-O-malonylglycitine	39	3
6"-O-acetyldaidzine	22	18
6"-O-acetylgenistine	820	66
6"-O-acetylglycitine	89	7

Les broyats ou mélasses résultant de la production du lait de soja  
5 représentent également une source d'isoflavones de soja.

Par "extraits d'isoflavones de soja", on entend ainsi selon l'invention les  
extraits d'isoflavones de soja obtenus à partir des différents produits du soja décrits  
ci-dessus (graines, germes de soja (ou "soja germé"), les laits de soja dont broyats et  
mélasses et les produits fermentés (en particulier Tofu et Tempeh)), extraits qui ont  
10 éventuellement été purifiés et/ou concentrés pour augmenter leurs teneurs en  
isoflavones, selon des méthodes bien connues de l'homme du métier.

L'utilisation selon l'invention est ainsi également caractérisée en ce que ledit  
produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du soja.

On peut en particulier citer l'extrait d'isoflavones de soja commercialisé par la  
15 Société Nutrinov sous la dénomination Genosten 4000<sup>R</sup>. Il s'agit d'un extrait soluble  
de soja enrichi en isoflavones obtenu après concentration par évaporations

successives des mélasses de soja. Ce procédé ne fait appel à aucun solvant organique. On trouvera des données analytiques sur ce produit dans les exemples ci-après.

Le lupin (*lupinus*) est également une source naturelle intéressante en isoflavones. On peut citer en particulier la variété du "lupin jaune" dans les tiges duquel ont notamment été identifiées les isoflavones glycosylées génistine, 2'-hydroxygénistéin-7-0-glucoside, génistéin-4'-0-glucoside et la génistéin-C-8-glucoside dont les formules respectives sont décrites ci-dessus (Rafal Franski et al, "Application of mass spectrometry to structural identification of flavonoid monoglycosides isolated from shoot of lupin (*lupinus luteus L.*)", Acta Biochimica Polonica, vol. 46, N° 2/1999, 459-473).

L'utilisation selon l'invention est ainsi également caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du lupin c'est-à-dire, par analogie avec la définition ci-dessus pour les extraits d'isoflavones du soja, parmi les extraits d'isoflavones pouvant être obtenus à partir des produits du lupin.

Les extraits de prunier d'Afrique ou "*Pygeum Africanum*" sont bien connus de l'homme du métier. Ils sont principalement issus de l'écorce du prunier d'Afrique. Il s'agit d'extraits stéroliques de prunier d'Afrique, tels que ceux commercialisés par les sociétés Euromed et Indena sous les dénominations respectives "*Pygeum*" et "*Prunus Africana*". Des caractéristiques physico-chimiques de ces deux extraits sont données dans les exemples ci-après.

On utilise en particulier selon l'invention le produit tel que décrit ci-dessus, sous forme d'isoflavone(s) de soja, d'extrait(s) de prunier d'Afrique ou d'un mélange de ces derniers, selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids (utilisation sous forme pure possible dudit produit), de préférence entre environ 0,01 et environ 70 % en poids, et plus particulièrement encore entre environ 0,1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

La composition préparée par l'utilisation selon l'invention peut en outre comprendre un excipient pharmaceutiquement, dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable. On peut utiliser tout excipient adapté pour les formes galéniques connues de l'homme de métier, en vue d'une administration par voie topique, orale, entérale ou parentérale, notamment rectale.

En particulier, cet excipient peut être adapté pour l'obtention d'une composition sous forme d'une solution huileuse, d'une émulsion eau-dans-huile, une émulsion huile-dans-eau, une microémulsion, un gel huileux, un gel anhydre, une crème, une dispersion de vésicules, de microcapsules ou de microparticules, ou encore de gellules ou de capsules molles de gélatine ou végétales.

De préférence, on utilise un excipient adapté pour une administration par voie topique externe ou par voie rectale.

L'effet avantageux d'inhibition de l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase fourni par l'utilisation selon l'invention permet de destiner la composition ainsi préparée à des traitements thérapeutiques, notamment dermatologiques, et cosmétiques.

Ainsi, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement des pathologies et/ou des désordres cutanés liés à une exagération congénitale ou acquise de l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase.

En particulier, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hypertrophie prostatique.

En outre, l'utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'adénome prostatique.

L'utilisation d'un excipient adapté pour une administration par voie rectale comme décrit ci-dessus peut être particulièrement envisagée pour ces traitements de l'hypertrophie et/ou de l'adénome prostatique.

L'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'acné.

L'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hyper séborrhée.

Enfin, l'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'alopécie.

L'utilisation selon l'invention est également caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hirsutisme.

La présente invention a encore pour objet une méthode de traitement cosmétique de la peau grasse, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau une composition cosmétique contenant au moins un produit choisi dans le groupe

constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, tels que décrits ci-dessus.

L'invention a par ailleurs pour objet une méthode de traitement cosmétique de la chute des cheveux, caractérisée en ce qu'on applique sur le cuir chevelu une  
5 composition cosmétique contenant au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, tels que décrit ci-dessus.

Enfin, l'invention a également pour objet une méthode de traitement cosmétique de l'excès de pilosité, caractérisée en ce qu'on applique sur les zones de  
10 la peau présentant des excès de pilosité une composition cosmétique contenant au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, tels que décrits ci-dessus.

En effet, à l'opposé des traitements médicaux hormonaux, ces deux dernières méthodes de traitement cosmétique permettent d'améliorer l'apparence en réduisant  
15 de manière visible les phénomènes disgracieux de chute de cheveux liés à l'alopecie et les phénomènes d'excès de pilosités liés à l'hirsutisme.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de ces méthodes de traitements cosmétiques, ledit produit est présent dans la composition selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids (utilisation sous forme pure  
20 possible, sans excipient), de préférence entre environ 0,01 et environ 70 % en poids, et plus particulièrement encore entre environ 0,1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, la composition cosmétique appliquée selon la méthode cosmétique de l'invention contient en outre au moins un excipient cosmétiquement  
25 acceptable tel que décrit ci-dessus.

Enfin, l'invention a encore pour objet l'utilisation d'au moins un composé choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, tels que décrits ci-dessus, en tant qu'additif dans un aliment pour l'être humain et/ou l'animal. Cette utilisation alimentaire est de  
30 préférence caractérisée en ce que ledit additif est présent dans l'aliment selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, de préférence

entre environ 0,01 et environ 70 % en poids, et plus particulièrement encore entre environ 0,1 et 10 % en poids, par rapport au poids total de l'aliment.

Les exemples suivants sont destinés à illustrer la présente invention et ne doivent en aucun cas être interprétés comme pouvant en limiter la portée.

- 5 A moins qu'il n'en soit précisé autrement, les pourcentages indiqués dans les exemples suivants sont des pourcentages en poids.

**Exemple 1 : Evaluation de l'activité inhibitrice sur l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase par mesure du taux de 5-dihydrotestostérone formée à partir de la**  
10 **testostérone par les cellules DU145.**

## **1. Matériel et méthodes**

### **1.1 Matériel**

Les cellules prostatiques DU145 sont issues d'une lignée tumorale obtenue à  
15 partir d'un carcinome de la prostate (N° ATCC HTB 81). Le milieu MEM (réf.0410265), la glutamine et la gentamycine viennent de chez Gibco. Le sérum de veau fœtal (SVF) vient de chez DAP et est utilisé décomplémenté (45 mm à 56°C). les plastiques servant à la culture (boîtes et plaques) viennent de chez Costar. La  
testostérone vient de chez Sigma.

20

### **1.2 Méthode**

#### **1.2.1 Préparation des gammes de produits**

Une solution mère en éthanol à 10 mg/ml est préparée à partir de chacun des  
produits testés.

25

La gamme de concentration utilisée pour les expériences est la suivante : 0, 5, 10, 50, 100 et 500 microgrammes/ml. (Dilution effectuée dans le milieu de culture). Le volume d'extrait ajouté par puits étant de 20 microlitres/puits, les solutions à préparer sont concentrées 50X.

30

### Préparation de la Testostérone

Une solution mère de testostérone à 10 mM est préparée dans l'éthanol. Au moment de son utilisation, cette solution est diluée au 1:1000 dans le milieu de culture et 10 microlitres sont ajoutés par puits.

5

### **1.2.2. Expérience d'inhibition de la 5 $\alpha$ -réductase des DU 145**

Les cellules prostatiques DU145 sont cultivées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> dans un milieu MEM contenant de la glutamine (2mM), de la gentamycine (50 microgrammes/ml) et 10% de SVF. Leur taux de sous-culture est de 1:10.

10

Avant de lancer l'expérimentation, les cellules sont mises en culture dans des plaques 6 puits à raison de  $2 \cdot 10^5$  DU145 par puits/1 ml de milieu ne contenant que 1% de SVF. Les cellules sont maintenues 3 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Le jour de l'expérience, le milieu de culture contenu dans les puits est éliminé et remplacé par du milieu neuf contenant 1% de SVF. La testostérone (0,1 micromolaire final) ainsi que les extraits aux différentes concentrations sont ajoutés au milieu à raison de 10 et 20 microlitres/puits respectivement. (Les puits "contrôles" correspondent à des cellules incubées en présence de testostérone et d'un équivalent Ethanol. Ceci permet de soustraire l'effet du solvant sur les cultures et de déterminer le pourcentage de DHT formée en absence d'inhibiteur). Les cellules sont alors incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Au bout de 3 heures, les surnageants de culture sont collectés et congelés à -80°C jusqu'au dosage.

15

20

### **Mesure du taux de DHT formée**

Principe: extraction des produits lipophiles par l'éther, concentration des échantillons en DIIT par chromatographie d'affinité et dosage radio-immunologique

25

#### Préparation des échantillons

- Après avoir agité au vortex les prélèvements, introduire les échantillons dans des flacons "SEPEX"

30

- Ajouter dans chaque tube 0,1 ml de la solution radioactive "3H-Rdt" (pour évaluation du rendement d'extraction). Boucher les flacons, les agiter un par un au vortex.



- Laisser reposer 30 min à température ambiante. Puis agiter de nouveau chaque flacon au vortex.
- Ajouter dans chaque flacon : 5 ml d'éther éthylique.
- Boucher les flacons et les agiter manuellement de façon énergique. Laisser décanter
- 5 quelques minutes.
- Congeler les phases aqueuses à -30°C, pendant au moins 1 heure.
- Recueillir la phase étherée dans un tube à essai en boro-silicate de 5 ml correspondant.
- Evaporer totalement la phase étherée à l'aide du système évaporateur + bain-marie à
- 10 37°C.

#### Séparation de la DHT

- Préparation des colonnes : Préparer les colonnes dans des pipettes de culture en verre de 5 ml avec 10 cm de chromatolithe A.
- 15 • Rinçage des colonnes : 3 ml d'iso-octane pur combitips (3 fois), en laissant couler par simple gravité.
- Elution des extraits étherés secs
- Chaque extrait sec est repris par 1 ml d'iso-octane pur, vortexer vigoureusement. Attendre 15 min à température ambiante. Réagiter au vortex.
- 20 - Lorsque les 3 ml d'iso-octane (lavage des colonnes) sont élués, transvaser les extraits étherés secs repris par l'iso-octane sur la colonne. Laisser éluer.
- Rincer chaque tube "extrait sec" avec 1 ml d'iso-octane pur combitips, vortexer vigoureusement. Attendre 15 min à température ambiante. Réagiter au vortex et transvaser dans la colonne comme précédemment.
- 25 - Laver par 4 ml d'iso-octane pur.
- Recueil de la DHT
- Préparer le solvant d'élution (mélange à 6% iso-octane/acétate d'éthyl: 94/6 (v-v))
- Eluer par 6 ml (pipette) de ce mélange.
- Recueillir l'éluat DHT dans les tubes à essais en boro-silicate de 5 ml identifiés.
- 30 • Traitement de l'éluat DHT : Evaporer le solvant de l'éluat à l'aide du système évaporateur-bain-marie (37°C)

### Dosage RIA

- Protocole de distribution : Reprendre les échantillons par 0,5 ml de tampon RC, le Blanc par 1 ml de tampon Rcet, les Contrôles par 0,5 ml de tampon RC. Placer à l'étuve à 37°C 15 min Agiter de nouveau les tubes au sortir de l'étuve (1 min).
- 5
- Dans des tubes à hémolyse en verre identifiés de 5 ml, mettre dans l'ordre:
- \* **Tampon** : Activité Totale (AT): 0,7 ml de tampon RC, Activité Non Spécifique (N): 0,2 ml de tampon RC, Gamme : seul le point 0 de la gamme (noté B0) comporte 0,1 ml de tampon RC,
- 10
- \* **Solution étalon** (1000 à 7,8 pg/tube) : 0,1 ml de la solution étalon respective.
  - \* 0,1 ml d'extrait sec repris dans le tampon
  - Puis, distribuer l'**anti-sérum** : 0,1 ml dans tous les tubes sauf AT et N.
  - Puis, distribuer la **solution de dosage "3HD"** : 0,1 ml dans tous les tubes.
  - Vortexer et recouvrir d'un parafilm.
- 15
- Incubation à 4°C, pendant 1h30 minimum (24 h. maximum).
  - Préparation du charbon-dextran : Mettre la suspension de charbon-dextran dans un bécher, puis, dans un bain d'eau glacé à 4°C, pendant au moins 1h30.
  - Rendement de purification en DHT
  - Dans 6 petites fioles à scintillation (3 par série) déposer : 0,4 ml de tampon RC + 0,1 ml de la solution "3H-Rdt" (flacon du premier jour au réfrigérateur). Blancs : mettre 0,5 ml d'extrait sec reconstitué pour le blanc. Echantillons et contrôles : mettre 0,25 ml de tampon RC + 0,25 ml d'extrait.
  - Ajouter 5 ml de liquide à scintillation dans toutes les fioles.
- 20
- 25
- Séparation de la DHT libre de celle liée à l'anticorps
- Mettre la suspension de charbon-dextran sous agitation magnétique, dans une bassine d'eau glacée.
  - Ajouter 0,5 ml de charbon-dextran dans tous les tubes sauf AT en 2 min maximum.
  - Vortexer, remettre les tubes dans l'eau glacée. Attendre 10 min exactement.
- 30
- Centrifuger à 4°C, 3400 rpm, pendant 11 min

- Pipeter 0,5 ml de chaque surnageant (y compris AT) dans une petite fiole de comptage
  - Ajouter 5 ml de liquide scintillant. Agiter, laisser s'équilibrer 30 min à température ambiante.
- 5 - Mettre a compter 2 min avec le compteur  $\beta$  (Beckman, LS 6000 SE).

## 2. Bulletins analytiques des produits testés

2.1. L'extrait d'isoflavones de soja testé, dénommé Genosten 4000, a été fourni par la société Nutrinov.

10

*Description* : Extrait soluble de soja enrichi en isoflavones obtenu par une technique d'extraction physique, sans utilisation de solvants organiques.

### *Caractéristiques physico-chimiques :*

Densité	400 g/l
Humidité	< 5 %
PH (solution aqueuse à 4%)	8
Solubilité dans l'eau	100 %

15

### *Composition :*

Protéines	11 %
Lipides	< 0.5 %
Glucides	60 %
Sodium	1500 mg/100g
Calcium	< 100 mg/100g
Potassium	5500 mg/100g
Phosphore	300 mg/100g

### *Composition en isoflavones :*

Teneur totale en isoflavones :	4000 +/- 200 mg/100 g
Profil type :	
Daidzine	200
Genistine	280
Malonyldaidzine	900
Malonylgénistine	2080
Daidzéine	30
Génistéine	10

2.2. L'extrait de *Pygeum Africanum* testé a été fourni par la société Euromed.

5 **Description :** Extrait lipido-stérolique de *Pygeum Africanum* issu de l'écorce de pygeum.

**Caractéristiques physico-chimiques :**

Aspect	pâte visqueuse de couleur marron prononcé, avec une odeur caractéristique
Solubilité	Insoluble dans l'eau, soluble dans le chloroforme
Perte à la dessiccation	3 % max.
Cendres	0.4 % max.
Absorption UV	Maxima à 242 ; 282 et 320 nm

**Composition chimique**

Indice d'acide 39 mg KOH/g

**Composition en acides gras (%)**

C12:0	0.3
C16:0	44.6
C18:0	5.6
C18:1	36.6
C18:2	9.8
C18:3	0.6
Teneur en insaponifiable	17.6 %
Stérols	14.7

**3. Résultats - Evaluation de la conversion de la testostérone en 5-dihydrotestostérone par les cellules DU 145 – Détermination des IC 50**

**Tableau 4**

Produit testé	IC 50 (µg/ml)
Extrait d'isoflavones de soja (Genosten 4000)	71
Extrait de Pygeum Africanum	203
Sereoa repens	60

5

**4. Conclusions**

L'extrait de serenoa Repens, choisi comme substance de référence, inhibe l'activité de la 5-alpha réductase. Ce résultat valide donc le test.

10 L'extrait d'isoflavones de soja, faiblement chargé en isoflavones (4 %), est aussi actif que l'extrait de serenoa Repens, choisi comme substance de référence inhibitrice de l'activité de la 5-alpha réductase.

L'extrait de Pygeum Africanum testé est actif dans l'inhibition de la 5-alpha réductase.

15 **Exemple 2 : Evaluation in vitro de l'activité de la 5-α réductase sur la conversion de la testostérone en 5α-dihydrotestostérone dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux.**

20

**Abréviations utilisées dans ce qui suit :**

- 25 <sup>3</sup>H : tritium
- CCM : chromatographie en couche mince
- Ci : Curie
- DMSO : diméthyl sulfoxyde
- M199 : appellation donnée à un milieu de culture standard

- MCF : milieu de culture des fibroblastes
- MEM : appellation donnée au milieu de culture, *Minimum Essential medium*
- MIF : milieu d'incubation des fibroblastes
- 5 Rf : facteur de rétention relatif
- SVF : sérum de veau fœtal
- 5 $\alpha$ -DHT : 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone

On se propose d'évaluer l'effet des produits tels qu'un extrait d'isoflavones de soja (Genosten 4000, décrit ci-dessus), de la génistéine et de la génistine (isoflavones purifiées, produits commerciaux Sigma), d'un extrait de *Pygeum Africanum*, d'un extrait de *Serenoa Repens* choisi comme référence, sur l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase. Un modèle *in vitro* de cultures de fibroblastes dermiques humains normaux a été retenu.

15

## 1. Matériels et méthodes

### 1.1 Produits à l'essai, produit de référence, et réactifs

Les produits à l'essai ont été fournis par EXPANSCIENCE et ont été conservés à +4°C jusqu'au moment de leur utilisation.

20 La testostérone radioactive (marquée au tritium en position 1, 2, 6 et 7, activité spécifique 79 Ci/mmol) était fournie par AMERSHAM, la testostérone non-radiomarquée était fournie par SIGMA.

Les réactifs de qualité analytique, provenaient de chez SIGMA, MERCK, BDH, ALDRICH ou CARLO ERBA sauf indication contraire.

25

### 1.2 Système d'essai

Le milieu de culture des fibroblastes (MCF) était constitué par du MEM/M199 (3:1, v/v) additionné de pénicilline (50 UI/ml), de streptomycine (50  $\mu$ g/ml), de bicarbonate de sodium (0,2 %, p/v) et de SVF (10 %, v/v).

Le système d'essai était constitué de fibroblastes dermiques humains normaux cultivés en monocouche. Les fibroblastes ont été isolés à partir d'un résidu de plastie abdominale réalisée chez une femme de 51 ans (sujet BIOPREDIC n°10013). Les cellules ont été utilisées au cinquième passage, elles ont été cultivées jusqu'à confluence des monocouches dans le milieu MCF à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 1.3 Préparation des produits et incubation avec le système d'essai

Le milieu d'incubation des fibroblastes (MIF) était constitué de MCF additionné de testostérone tritiée ( $1,6 \times 10^{-7}$  M, soit 6,32 µCi/ml) et de testostérone non radiomarquée ( $3,84 \times 10^{-6}$  M).

Les produits à l'essai et le finastéride ont été repris dans du DMSO avant d'être dilué dans le milieu d'incubation. La concentration finale en DMSO a été maintenue constante et égale à 1% (v/v) dans chaque dilution de produits à l'essai et de produit de référence.

Echelle de temps :



- ↕: élimination du milieu MCF
- ↕↕: pré-incubation des produits à l'essai et du produit de référence préparés dans le milieu MCF
- ↘: élimination des milieux MCF contenant les produits à l'essai ou le produit de référence
- ↑: incubation des produits à l'essai et du produit de référence préparés dans le milieu MIF
- ⊗: détermination de l'activité de la 5α -réductase

Les cultures de fibroblastes ont été pré-incubées en présence des produits à l'essai ou du produit de référence pendant 2 heures avant l'ajout du substrat, la

testostérone. Pour cette étape, les produits à l'essai et le produit de référence ont été préparés dans le milieu MCF.

Après la pré-incubation, les cultures de fibroblastes ont été incubées en présence des produits à l'essai ou du produit de référence préparés dans le milieu MIF pendant 22 heures (ou 24 heures, indiqué avec les résultats) à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Des cultures témoins ont été incubées dans le milieu MIF en absence de produits à l'essai et de produit de référence. Des cultures «témoin DMSO» ont été incubées dans le milieu MIF contenant 1% (v/v) de DMSO.

Chaque condition expérimentale a été testée en triplicate.

#### 1.4 Evaluation des effets

Après la période d'incubation, les cellules ont été soumises à l'action des ultrasons dans le milieu MIF. Les lysats cellulaires ainsi obtenus ont été extraits par du dichlorométhane. Après évaporation, les résidus secs ont été repris dans du méthanol et ont été déposés sur des plaques de silice 60F<sub>254</sub> (MERCK, référence 5554).

Des standards non radiomarqués, la testostérone, la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone et l'androstènedione, ont été déposés sur chacune des plaques.

Le solvant de migration était un mélange de dichlorométhane et d'éther (7:3, v/v) A la fin de la migration, les plaques de silices ont été lues à l'aide d'un scanner de radioactivité BERTHOLD.

Les standards non radiomarqués ont été mis en évidence par pulvérisation d'acide sulfurique à 5 % (v/v) sur les plaques de chromatographie chauffées ensuite à 100°C pendant 10 minutes.

La comparaison des R<sub>f</sub> (facteur de rétention relatif) déterminés pour les standards avec ceux obtenus pour les différents métabolites radioactifs a permis l'identification de ces derniers.

La métabolisation de la testostérone en 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone dans les différentes conditions expérimentales a été calculée : les résultats (aires des pics de



5 $\alpha$ -dihydrotestostérone comptés par le scanner BERTHOLD) ont été exprimés en pmoles de 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone formées par puits de culture. Ils ont aussi été exprimés en pourcentage de l'activité 5 $\alpha$ -réductase présente dans le groupe 'témoin DMSO'.

5

## 2.5 - Traitement des données

Les groupes de données (groupe témoin et groupes traités) ont été traités par une analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1,  $p < 0,05$ ), suivie par un test de DUNNETT ( $p < 0,05$ ). L'effet des produits à l'essai et du produit de référence a été comparé au groupe 'témoin DMSO'. Les effets des produits à l'essai ont été comparés entre eux par une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA 2,  $p < 0,05$ , facteur 1 = concentration et facteur 2 = traitement).

## 2. Résultats et discussion

15 On se reportera au paragraphe 3 suivant pour les tableaux de résultats détaillés.

### 2.1. Génistine et génistéine

20 Dans les échantillons 'témoin DMSO' (0,1% v/v), la vitesse de métabolisation de la testostérone était de 11,40 +/- 0,75 pmoles de 5 $\alpha$ -DHT formées en 24 heures par puits de culture (tableau paragraphe 3.1). Cette vitesse était conforme aux résultats déjà obtenus au laboratoire.

La génistine, testée à 0,1 ; 1 et 10  $\mu\text{g/ml}$ , n'avait pas d'effet d'inhibition significatif ( $p < 0,05$ ) sur l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase. A 100  $\mu\text{g/ml}$ , ce produit inhibait significativement ( $p < 0,05$ ) de 32% l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase.

25 La génistéine, testée à 0,1 ; 1 et 10  $\mu\text{g/ml}$ , inhibait significativement ( $p < 0,05$ ) de 32% ; 33% et 31% respectivement l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase. A 100  $\mu\text{g/ml}$ , il inhibait significativement ( $p < 0,05$ ) de 61% l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase.

En conclusion, la génistéine est nettement plus active que la génistine.

30

## 2.2 Extrait d'isoflavones de soja

Dans les cultures témoins, la vitesse de métabolisation de la testostérone était de 9,71 +/- 0,77 pmoles de 5 $\alpha$ -DHT formées en 22 heures par puits de culture (tableau paragraphe 3.2). Cette vitesse était conforme aux résultats déjà obtenus au laboratoire.

5

L'extrait d'isoflavones de soja, testé à 10 et 100  $\mu$ g/ml, inhibait respectivement de 22 et 17% l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase.

L'extrait de *Serenoa Repens*, testé à 10 et 100  $\mu$ g/ml, inhibait respectivement de 15 et 35% l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase. A 1  $\mu$ g/ml, il n'avait pas d'effet.

10

En conclusion, dans les conditions expérimentales retenues, les extraits d'isoflavones de soja et de *Serenoa Repens* (référence) inhibaient l'activité de la 5 $\alpha$  réductase. L'extrait d'isoflavones de soja présente une activité d'inhibition de la 5 $\alpha$  réductase supérieure à celle de l'extrait de *Serenoa Repens*.

15

## 2.3. Extrait de *Pygeum Africanum*

Dans les cultures témoins, la vitesse de métabolisation de la testostérone était de 9,71 +/- 0,77 pmoles de 5 $\alpha$ -DHT formées en 22 heures par puits de culture (tableau paragraphe 3.3.). Cette vitesse était conforme aux résultats déjà obtenus au laboratoire.

20

Les effets des produits à l'essai ont été comparés à ceux obtenus en présence du finastéride, utilisé comme produit de référence en plus de l'extrait de *Serenoa Repens*.

Le finastéride, testé à 3 et 30 ng/ml, inhibait respectivement l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase de 36 et 65% (tableau 1). Ce résultat était attendu et valide l'étude.

25

L'extrait de *Serenoa Repens*, testé à 10 et 100  $\mu$ g/ml, inhibait respectivement de 15 et 35% l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase. A 1  $\mu$ g/ml; il n'avait pas d'effet (tableau 2).

L'extrait de *Pygeum Africanum*, testé à 1, 10 et 100  $\mu$ g/ml, inhibait respectivement de 33, 22 et 30% l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase (tableau 2).

30

En conclusion, les extraits de *Serenoa Repens* et de *Pygeum Africanum* inhibaient de façon quasi identique l'activité de la 5 $\alpha$  réductase.

### 3. Tableaux de résultats détaillés

#### 3.1. Effet de la génistine et de la génistéine sur l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux, après 24 heures d'incubation

5

Produit	DMSO	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	1% (v/v)	0,1	1	10	100
Génistine	10,56	11,72	9,80	13,64	7,12
	12,00	11,16	9,88	14,12	8,84
	11,64	9,36	10,16	12,64	7,20
	<b>11,40<math>\pm</math>0,75</b>	<b>10,75<math>\pm</math>1,23</b>	<b>9,95<math>\pm</math>0,19</b>	<b>13,47*<math>\pm</math>0,76</b>	<b>7,72*<math>\pm</math>0,97</b>
	<i>100</i>	<i>94</i>	<i>87</i>	<i>118</i>	<i>68</i>
Génistéine	10,56	8,04	7,52	7,96	4,24
	12,00	7,52	8,56	8,68	4,96
	11,64	7,72	7,00	6,88	4,16
	<b>11,40<math>\pm</math>0,75</b>	<b>7,76*<math>\pm</math>0,26</b>	<b>7,69*<math>\pm</math>0,79</b>	<b>7,84*<math>\pm</math>0,91</b>	<b>4,45*<math>\pm</math>0,44</b>
	<i>100</i>	<i>68</i>	<i>67</i>	<i>69</i>	<i>39</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 $\alpha$ -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe 'DMSO 0,1% (v/v)'

\* : moyenne significativement différente du groupe 'DMSO 0,1% (v/v)'

**3.2 Effet des extraits de *Serenoa Repens* et d'isoflavones de soja (Genosten 4000) sur l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux après 22 heures d'incubation**

5

Produit	DMSO	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	1% (v/v)	1	10	100
<b><i>Serenoa Repens</i></b>	8,00	7,72	6,84	5,48
	8,92	9,20	7,48	5,68
	8,68	8,08	7,52	5,44
	<b>8,53<math>\pm</math>0,48</b>	<b>8,33<math>\pm</math>0,77</b>	<b>7,28*<math>\pm</math>0,38</b>	<b>5,53*<math>\pm</math>0,13</b>
	<i>100</i>	<i>98</i>	<i>85</i>	<i>65</i>
<b>Extrait d'isoflavones de soja (Genosten 4000)</b>	8,00		6,24	7,04
	8,92		6,52	7,12
	8,68		7,12	7,12
	<b>8,53<math>\pm</math>0,48</b>		<b>6,63*<math>\pm</math>0,45</b>	<b>7,09*<math>\pm</math>0,05</b>
	<i>100</i>		<i>78</i>	<i>83</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 $\alpha$ -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe DMSO

\* : moyenne significativement différente du groupe DMSO ( $p < 0,05$ )

### 3.3. Effet du finastéride et des extraits de *Serenoa Repens* et *Pygeum Africanum* sur l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase dans des cultures de fibroblastes dermiques humains normaux après 22 heures d'incubation

5

#### 3.3.1. Finastéride

Témoin	DMSO 1% (v/v)	Finasteride (ng/ml)	
		3	30
9,24	8,00	5,52	2,92
9,28	8,92	5,84	2,92
10,60	8,68	5,00	3,00
<b>9,71*<math>\pm</math>0,77</b>	<b>8,53<math>\pm</math>0,48</b>	<b>5,45*<math>\pm</math>0,42</b>	<b>2,95*<math>\pm</math>0,05</b>
<i>114</i>	<i>100</i>	<i>64</i>	<i>35</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 $\alpha$ -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe DMSO

\* : moyenne significativement différente du groupe DMSO ( $p < 0,05$ )

#### 3.3.2. Extraits de *Serenoa Repens* et *Pygeum Africanum*

Produit	DMSO 1% (v/v)	Concentration ( $\mu$ g/ml)		
		1	10	100
<b>Serenoa Repens</b>	8,00	7,72	6,84	5,48
	8,92	9,20	7,48	5,68
	8,68	8,08	7,52	5,44
	<b>8,53 <math>\pm</math> 0,48</b>	<b>8,33 <math>\pm</math> 0,77</b>	<b>7,28* <math>\pm</math> 0,38</b>	<b>5,53* <math>\pm</math> 0,13</b>
	<i>100</i>	<i>98</i>	<i>85</i>	<i>65</i>
<b>Pygeum Africanum</b>	8,00	5,00	6,36	5,84
	8,92	5,64	7,28	6,52
	8,68	6,40	6,20	5,60
	<b>8,53 <math>\pm</math> 0,48</b>	<b>5,68* <math>\pm</math> 0,70</b>	<b>6,61* <math>\pm</math> 0,58</b>	<b>5,99* <math>\pm</math> 0,48</b>
	<i>100</i>	<i>67</i>	<i>78</i>	<i>70</i>

Les résultats sont exprimés en pmoles de 5 $\alpha$ -DHT formées/puits de culture.

En gras : moyenne et écart type

En italique : pourcentage du groupe DMSO

\* : moyenne significativement différente du groupe DMSO ( $p < 0,05$ )

**Exemple 3 : composition d'un shampooing pour cheveux gras.**

		%
5	Aqua	q.s.p. 100,000
	Sodium Lauroamphoacetate	14,000
	Coco-Glucoside	10,000
	Magnesium Laureth Sulfate	5,000
10	PEG-40 Glyceryl Cocoate	3,450
	PEG-150 Distearate	1,850
	Sodium Coceth Sulfate	1,050
	Citric Acid	0,450
	Disodium EDTA	0,300
15	Parfum	0,200
	Methylparaben	0,160
	Butylparaben	0,060
	Isoflavone de Soja	1,000
20	Pygeum Africanum	0,500

**Exemple 4 : composition d'une émulsion pour peau grasse**

		%
25	Aqua	q.s.p. 100
	Di-C12-13 Alkyl Malate	10,000
	Glycérine	5,000
	PEG-5 Glyceryl Stearate	3,500
	Glyceryl Stearate	1,500
30	Ceresin	1,500
	PEG-40 Stearate	1,500
	Sorbitan Stearate	1,000
	Zinc PCA	1,000
	Cetyl Alcohol	1,000
35	Polyacrylamide	1,000
	C13-14 Isoparaffin	0,500
	Parfum	0,500
	Piroctone Olamine	0,300
	Laureth-7	0,125
40	Sodium Polyacrylate	0,065
	Citrate de glycérides de palme hydrogénés	0,040
	Isoflavone de Soja	2,000

**Exemple 5 : composition d'une émulsion pour peau grasse**

		%
5	Aqua	q.s.p. 100
	Di-C12-13 Alkyl Malate	10,000
	Glycérine	5,000
	PEG-5 Glyceryl Stearate	3,500
	Glyceryl Stearate	1,500
10	Ceresin	1,500
	PEG-40 Stearate	1,500
	Sorbitan Stearate	1,000
	Zinc PCA	1,000
	Cetyl Alcohol	1,000
15	Polyacrylamide	1,000
	C13-14 Isoparaffin	0,500
	Parfum	0,500
	Piroctone Olamine	0,300
	Laureth-7	0,125
20	Sodium Polyacrylate	0,065
	Citrate de glycérides de palme hydrogénés	0,040
	Pygeum Africanum	1,000
	Acide Salicylique	1,000
25		
30		
35		

### Revendications

1. Utilisation d'au moins un produit choisi dans le groupe constitué par les isoflavones, les extraits de prunier d'Afrique et les mélanges de ces derniers, pour la  
5 préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est destinée à inhiber l'isoenzyme de type 1 et/ou l'isoenzyme de type 2 de la 5 $\alpha$ -réductase.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le produit  
10 est choisi parmi les isoflavones synthétiques ou d'origine naturelle.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les isoflavones synthétiques ou d'origine naturelles du groupe constitué par les génistine, daidzine, glycitine, acétyldaidzine, acétylgenistine, acétylglycitine, malonyldaidzine, malonylgenistine,  
15 malonylglycitine, la 2,4,4'-trihydroxydeoxybenzoïne (THB), la daidzéine, la génistéine, la glycitéine, la formononectine, la biochanine A, la génistéin-4'-O-glucoside, la 2'-hydroxygénistéin-7-O-glucoside, la génistéin-C-8-glucoside et les mélanges de ces derniers.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes,  
20 caractérisée en ce que produit est choisi dans le groupe constitué par la génistine, la génistéine et les mélanges de ces derniers.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du soja.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en  
25 ce que le produit est choisi parmi les extraits d'isoflavones du lupin.

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le produit est utilisé selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, par rapport au poids total de la composition.



9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition préparée comprend un excipient pharmaceutiquement, dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable.

5 10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'excipient est adapté pour une administration par voie topique externe ou par voie rectale.

11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement des pathologies et/ou des désordres cutanés liés à une exagération congénitale ou acquise de l'activité de la 5 $\alpha$ -réductase.

10 12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hypertrophie prostatique.

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'adénome prostatique.

15 14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'acné.

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hyperséborrhée.

16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'alopecie.

20 17. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de l'hirsutisme.

18. Méthode de traitement cosmétique de la peau grasse, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau une composition cosmétique contenant au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 et 3 à 7.

25 19. Méthode de traitement cosmétique de la chute des cheveux, caractérisée en ce qu'on applique sur le cuir chevelu une composition cosmétique contenant au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 et 3 à 7.

30 20. Méthode de traitement cosmétique de l'excès de pilosité, caractérisée en ce qu'on applique sur les zones de la peau présentant des excès de pilosité une composition cosmétique contenant au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 et 3 à 7.

21. Méthode de traitement cosmétique selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, caractérisée en ce que ledit produit est présent dans la composition selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

5 22. Méthode selon l'une quelconque des revendications 18 à 21, caractérisée en ce que la composition cosmétique contient en outre au moins un excipient cosmétiquement acceptable.

10 23. Utilisation d'au moins un produit tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 et 3 à 7, en tant qu'additif dans un aliment pour l'être humain et/ou l'animal.

24. Utilisation selon la revendication 23, caractérisée en ce que le produit est présent dans l'aliment selon une proportion comprise entre environ 0,001 et environ 100 % en poids, par rapport au poids total de l'aliment.

15

20

25



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2803747

N° d'enregistrement  
national

FA 583255

FR 000573

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 99 22728 A (ARCH DEV CORP ;LIAO SHUTSUNG (US); HIIPAKKA RICHARD A (US)) 14 mai 1999 (1999-05-14) * page 2, ligne 25 - page 3, ligne 30 * * revendications 1-7 * Tableau 1, (compounds 10,17) Tableau 7, (compounds 23,31) * page 10, ligne 1 - page 15, ligne 26 * * page 21, ligne 31 - page 22, ligne 4 *	1-5,8-24	A61K7/48 A61K7/06 A61K35/78 A61K31/353 A61P17/08 A61P17/14 A61P17/10
X	JP 10 059995 A (FUJIMOTO BROS:KK) 3 mars 1998 (1998-03-03)  * abrégé *	1-3, 8-15,18, 21-24	
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1990-278125 XP002149039 "5-Alfa reductase inhibitors contg. iso:flavone cpd." & JP 02 193920 A (KAO COPRPORATION) * abrégé *	1-3,8,9, 11, 14-18, 21-24	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)  A61K
X	US 5 543 146 A (PEREZ CARLOS) 6 août 1996 (1996-08-06)  * colonne 2, ligne 11-16 * * colonne 3, ligne 22-28 * * revendications; exemples *	1-3, 8-10,12, 13,22-24	
X	US 5 972 345 A (CHIZICK STEPHEN ET AL) 26 octobre 1999 (1999-10-26)  * colonne 2, ligne 19-40; revendications *	1-3, 8-11,16, 19,21-24	
-/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
3 octobre 2000		Veronese, A	
<p><b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul                      Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie                      A : arrière-plan technologique                      O : divulgation non-écrite                      P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention                      E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.                      D : cité dans la demande                      L : cité pour d'autres raisons</p> <p>-----                      &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1108 12.94 (POC:316)



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

2803747

N° d'enregistrement  
national

FA 583255  
FR 0000573

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1986-129442 XP002149040 "Hair tonic preparation showing hair- growing effects containing extract bark prunus africana." & JP 61 068408 A (POLA KASEY KOGYO KK), 1986 * abrégé *	1-3, 8-11,16, 19,21-24	
P,X	SHIMIZU, KUNIYOSHI ET AL: "The 5.alpha.-reductase inhibitory components from heartwood of Artocarpus incisus. Structure-activity investigations" PLANTA MED. (2000), 66(1), 16-19 , XP000951500 * le document en entier *	1-3,8,9, 12-16, 19-22	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		3 octobre 2000	Veronese, A
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C35)

**RECHERCHE INCOMPLÈTE  
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 583255  
FR 0000573

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche ou ont fait l'objet d'une recherche incomplète, à savoir:

Revendications ayant fait  
l'objet de recherches incomplètes:  
1-24

Raison:

Les définitions "isoflavones" et "prunier d'Afrique" présentes dans la revendication 1 ont trait à une très grande variété de composés/produits. Un fondement et/ou un exposé ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés/produits revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés mentionnés dans la revendication 4, dans les description à la page 5-6 et aux extraits de prunier d'Afrique dénommés "Pygeum" et "Prunus Africana".

La définition "composition destinée à inhiber l'activité de la 5 alfa réductase" présente dans la revendication 1 ne définit pas les maladies pour lesquelles les compositions sont destinées. Par conséquent, la recherche a été limitée aux maladies mentionnés dans les revendications 12-20.

19

FRANCE

11 Publication No:

2 803 747

(use only for  
ordering copies)

NATIONAL INSTITUTE  
OF INDUSTRIAL PROPERTY

21 National Registration No:

00 00573

PARIS

51 Int Cl<sup>7</sup>: A 61 K 7/48, A 61 K 7/05, 35/78, 31/353  
A 61 P 17/08, 17/14, 17/10

12

PATENT APPLICATION

A1

22 Date of deposition: Jan 18, 2000

71 Applicant(s): LABORATOIRES PHARMASCIENCE  
S. A. - FRANCE

30 Priority:

72 Inventor(s): MSIKA, PHILIPPE and  
PICCIRILLI, ANTOINE

43 Date published: Jul 20, 2001 Bulletin 01/29

56 List of documents cited in the  
preliminary research report: *to be reported at  
end of present publication*

60 References to other related  
national documents:

73 Patentee(s):

74 Agent(s): REGIMBEAU.

54 USE OF ISOFLAVONES AND/OR EXTRACTS OF THE AFRICAN PLUM TREE IN  
PHARMACY, COSMETICS AND AS FOOD ADDITIVES.

57 The present invention relates to the utilization of at least one product selected from the group consisting of the isoflavones, extracts of the African plum tree and mixtures thereof, for preparation of a composition to inhibit the activity of 5 $\alpha$ -reductase. This allows one to achieve remarkable inhibition of the activity of 5 $\alpha$ -reductase and provides a new answer for treating skin pathologies and/or disorders related to a congenital or acquired exaggeration of the activity of 5 $\alpha$ -reductase, in particular for the treatment of prostate hypertrophy, prostate adenoma, acne, hyperseborrhea, alopecia, and hirsutis m. The invention relates also to cosmetic treatment methods, in particular for oily skin, as well as utilization as additives for human or animal food.

The present invention relates to the utilization of at least one product selected from the group consisting of the isoflavones, extracts of the African plum tree and mixtures thereof, for preparation of a composition to inhibit the activity of  $5\alpha$ -reductase, in particular for the treatment of prostate hypertrophy, prostate adenoma, acne, hyperseborrhea, alopecia, and hirsutism.

The invention relates also to cosmetic treatment methods, in particular for oily skin, as well as utilization as additives for human or animal food.

$5\alpha$ -reductase is an NADPH dependent microsomal enzyme which exists in the form of two isoenzymes synthesized by two different genes.

The Type 1 isoenzyme of  $5\alpha$ -reductase is found essentially in the liver and the skin, more particularly in the non-genital sebaceous glands of the skin and of the scalp, and appears at puberty. The Type 2 isoenzyme occurs predominantly in the prostate and at the surface of the skin in different sexual locations: the genital region, beard and it plays a role in sexual differentiation. The distributions of the Type 1 and 2 isoenzymes of  $5\alpha$ -reductase, at the skin level and the cutaneous appendages of men, are illustrated in Table I below.

There exists a certain number of pathologies for which an exaggeration of  $5\alpha$ -reductase activity is responsible for all, or a majority, of the troubles observed.

In the case of men, for example, the  $5\alpha$ -reductase enzyme, which is localized principally in the genital tissues, and in the skin, catalyzes the hydroxylation of testosterone to  $5\alpha$ -reductase dihydrotestosterone (DHT). Then, since the DHT is an androgen that is much more active than testosterone (about 2x), its effects are amplified in the tissues where DHT is produced. Too high an activity of  $5\alpha$ -reductase thus causes androgen levels in the form of DHT to be too elevated in the prostate, and over-stimulation of the latter translates into an undesirable increase that can lead to the pathology of prostatic hypertrophy, and even to prostatic adenoma which usually necessitates surgery.

**Table 1: Distribution of Type 1 and Type 2 Isoenzymes of 5 $\alpha$ -Reductase at the Skin Level and Cutaneous Appendages of Men**

		H5- $\alpha$ r1	H5- $\alpha$ r2
EPIDERMIS	basal-cell layer	++	+
	spinal layer	+	++
	granular layer	+	-
	horny layer	-	-
CORIUM	fibroblasts	++	-
SEBACEOUS GLANDS	basal cells	++	+
	glandular cells	++	-
SUDORAL ECCRINE GLANDS	excretory duct	-	-
	epithelial cells	++	-
	myoepithelial cells	++	+
HAIR FOLLICLE	cutaneous or dermal papilla	+	+?
	matrix cells	++	+
	internal epithelial sheathing	$\pm$	+++
	external epithelial sheathing	++	-
	arector muscle	+	-

Other dermatological-type pathologies may be observed in both men and women as a result of over-activity of 5 $\alpha$ -reductase, namely, in particular, acne, hirsutism or again alopecia.

In the skin, 5 $\alpha$ -reductase activity is greater in the sebaceous gland than in other structures. Moreover the seborrhoeic glands have a greater 5 $\alpha$ -reductase activity than cells in other regions of the skin. Consequently, the level of physiological sebaceous secretion appears to be directly related to the activity of this enzyme.

In the case of acne, 5 $\alpha$ -reductase hyperactivity exists. More than an increase in the level of androgens in the serum, there is an increase in the DHT precursor level, a principal factor in the sebaceous function that participates in acne.

Oily skin or seborrhea, apart from its unsightly appearance, is an area where complications can arise. It strikes areas where there are numerous sebaceous glands and leads principally to



androgenic over-stimulation of sebaceous production by these particular glands. Hyperseborrhea participates in the occurrence of the lesions common to acne.

The Type 1 isoenzyme of  $5\alpha$ -reductase is found in the scalp in the region of the sebaceous glands as well as in the hair follicle region. The Type 2 isoenzyme of  $5\alpha$ -reductase is localized predominantly at the level of the internal epithelial sheath as well as at the level of the Dermal Papilla of the hair. However, the latter localization has not yet been precisely confirmed.

Androgenic alopecia whose physiology is very close to that of acne is the most common form of alopecia, and without any doubt the one having the strongest demand for therapy.  $5\alpha$ -reductase appears to play a primary role in this pathology. In fact men having a genetic lack of Type 2 isoenzyme do not develop androgenic alopecia.

Taking into account that which has gone before, research has been oriented towards developing  $5\alpha$ -reductase inhibitors. Certain steroids like progesterone have been tested in this connection, but rapid metabolism renders them ineffective in vivo. To be active, the  $5\alpha$ -reductase inhibitor must be sufficiently stable to block in vitro enzyme activity. Finasteride, a competitive steroid I inhibitor fulfills this condition, but it is more active on the Type 2 isoenzyme than on the Type 1 isoenzyme and these two isoenzymes are only 50% homologous in their amino acid sequence. Finasteride has therefore already been tested above all in benign hyperplasia of the prostate.

Meanwhile, equally known as an inhibitor of  $5\alpha$ -reductase, the extract of *Serena Repens* has advantages relative to finasteride in that it has a natural origin, the plant extract permitting a better comparison to the naturally occurring products that have been tested. *Serena Repens*, also known as *Sabal Serrulanum*, is a small palm tree that is found in the United States (Florida), in North Africa, and in Spain.

It has now been found in a most surprising and unexpected manner that the use of certain compounds of plant origin permits a remarkable inhibition of the activity of  $5\alpha$ -reductase, providing in particular a new approach for treating the pathologies and/or dermatological disorders described above.

The present invention thus relates to the utilization of at least one product selected from the group comprising the isoflavones, extracts of the African plum tree and mixtures thereof, for the preparation of a composition to inhibition of the activity of  $5\alpha$ -reductase.

According to the invention, the expression above "and mixtures thereof" encompasses especially mixtures of isoflavones, mixtures of the African plum tree as well as mixtures of extracts of the African plum tree.

In particular, utilization according to the invention is characterized in that the composition is intended to inhibit the Type 1 isoenzyme and/or Type 2 isoenzyme of  $5\alpha$ -reductase.

The isoflavones utilizable according to the invention may be obtained by chemical synthesis or are natural substances extracted from natural products, in particular from plants.

The aglycone and glycoside forms of the isoflavones are distinct from each other. These diverse forms are illustrated by the following formulas.

Aglycone forms, of formula

*see original* (I)

wherein R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>6</sub> represent:

<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>R<sub>6</sub></u>	<u>Compound Name</u>
H	H	OH	Daidzein
OH	H	OH	Genistin
H	OCH <sub>3</sub>	OH	Glycitein
H	H	OCH <sub>3</sub>	Formononectin
OH	H	OCH <sub>3</sub>	Biochanin A

Glycosylic forms, of formula

*see original* (II)

where R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> and R<sub>5</sub> represent:

<u>R<sub>3</sub></u>	<u>R<sub>4</sub></u>	<u>R<sub>5</sub></u>	<u>Compound Name</u>
H	H	H	Daidzin
OH	H	H	Genistin
H	OCH <sub>3</sub>	H	Glycitin
H	H	COCH <sub>3</sub>	Acetyldaidzin
OH	H	COCH <sub>3</sub>	Acetylgenistin
H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	Acetylglycitin
H	H	COCH <sub>2</sub> COOH	Malonyldaidzin
OH	H	COCH <sub>2</sub> COOH	Malonylgenistin
H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> COOH	Malonylglycitin

One may also cite:

- Genistin-4'-O-glycoside of formula:

*see original* (III)

- 2'-hydroxygenistin- 7-O-glycoside of formula:

*see original* (IV)

- genistin-C-8-glycoside of formula:

*see original* (V)

- 2,4,4'-trihydroxydeoxybenzoin (THB) of formula:

*see original* (VI)

The glycosylic forms of the isoflavones are hydrolyzed by action of the beta-glycosides. The glycosylic forms (daidzin and genistin) and acyclics are the most abundant. Acid or enzymatic hydrolysis can render the conjugated forms of daidzein and genistin more absorbable.

Utilization according to the invention is characterized in that the product is selected from synthetic or natural isoflavones, from the group consisting of genistin, daidzin, glycitin, acetyldaizn, acetylgenistin, acetylglycitin, malonyldaizn, manolgenistin, manolyglycitin, the 2,4,4'-trihydroxy deoxybenzoin (THB), daidzin, genistin, glycitein, formononectin, biochanin A, genistin-4-O-glycoside, 2'-hydroxygenistein-7-O-glycoside, genistein-C-8-glycoside, and mixtures thereof.

In particular, it is preferred according to the invention to utilize a product selected from the group consisting of genistin, genistin and mixtures thereof.

No sources are known that are richer in isoflavones than soybean. The purification methods for isoflavones derived from soybean, in particular the seeds, soybean germ, soybean milk among which the grindings and molasses and the fermented products (in particular Tofu and Tempeh) are well known in the trade.

Table 2 below illustrates the isoflavone content (micrograms/gram) of soybeans from harvests in Iowa (Wang and Murphy, "Isoflavone Composition of American and Japanese Soybeans in Iowa": Effects of Variety, Crop Year and Location", J. Agric, Food Chem. 1994, 42, 1674-1677).

**Table 2: Examples of Isoflavone Content in Soybeans**

<u>Aglycone forms</u>	<u>µg/g/of Dry Extract</u>
Daidzin	7-60
Genistin	17-56
Glycitein	20-24
<b>Glycated Forms</b>	
Daidzin	180-780
Genistin	325-850
Glycitin	53-70
6''-O-malonydaidzin	121-410
6''-O-malonylgenistin	290-958
6''-O-malonylglycitin	61-72
6''-O-acetyldaidzin	trace
6''-O-acetylgenistin	2-10
6''-O-acetylglycitin	23-36

The soybean germ is the richest source of isoflavones.

Regarding soybean milk, it is traditionally obtained warm by grinding the beans after peeling, in an alkaline medium. A thermal treatment is carried out to inhibit antitriptic factors.

The quantities of isoflavones occurring in soybean milk are variable. Table 3 below illustrates the isoflavone contents of soybean milks.

**Table 3: Examples of Isoflavone Levels in Soybean Milk**

<u>Aglyconic Form</u>	<u>µg/g of dry extract</u>	<u>mg/l of Soybean</u>
Daidzin	18	1.4
Genistin	19	1.5
Glycitein	10	0.8
<b>Glycated Forms</b>		
Daidzin	410	33
Genistin	710	57
Glycitin	65	5
6"-O-malonydaidzin	690	55
6"-O-malonylgenistin	871	70
6"-O-malonylglycitin	39	3
6"-O-acetyldaidzin	22	18
6"-O-acetylgenistin	820	66
6"-O-acetylglycitin	89	7

The grindings or molasses resulting from the production of Soybean milk represent equally a source of soybean isoflavones.

The term "extracts of soybean isoflavones" is understood, according to the invention, to include soybean isoflavone extracts obtained from the different soybean products described above (seeds, soybean, germed soybean, soybean milks, including grindings and molasses, and fermented products (in particular Tofu and Tempeh)), products which have possibly been further purified and/or concentrated to increase their isoflavone content, according to methods known to those skilled in the art.

Utilization according to the invention is thus equally characterized in that the product is selected from extracts of soybean isoflavones.

In particular, a soybean isoflavone extract commercialized by the Nutrinov firm under the label Genosten 4000® may be cited. It consists of a soluble soybean extract enriched in isoflavones obtained after repeated concentration of soybean molasses. This procedure does not require any organic solvent. The analytical values for this product are given later.

Lupine (*lupinus*) is also an interesting natural source for isoflavones. One may cite in particular the 'yellow lupine' variety in the shoots of which glycosylated genistin isoflavones have been identified, in particular, 2'-hydroxygenistin-7-O-glycoside, genistin-4'-O-glycoside and genistin-C-8-glycoside whose respective formulas are given in (Rafal Franski et al, Application of Mass Spectrometry to Structural Identification of Flavonoid Monoglycosides from Shoot of Lupine? (*Lupinus Luteus L*)), Acta Biochimica Polonica, vol. 46, No. 2/1999, 459-473).

Utilization according to the invention is thus also characterized in that the product is selected from the isoflavone extracts of Lupine, that is to say, by analogy with the above definition for the isoflavone soybean extracts, among the isoflavone extracts obtainable from lupine products.

Extracts of the African plum tree or "*Pygeum Africanum*" are well known to those skilled in the art. They are derived principally from the bark of the African plum tree. It is concerned with sterol extracts of the African plum tree, such as those commercialized by the firms Euromed and Indena under respective listings "*Pygeum*" and "*Prunus Africana*". Physicochemical characteristics of these two extracts are given in the following examples.

According to the invention one utilizes in particular the product described above, under the form of soybean isoflavone(s), extract(s) of the African plum tree, or a mixture of the latter, in proportions between about 0.001 and 100 wt % (utilization of the purest possible form of the product)", preferably between about 0.01 and 70 wt %, and more particularly still between about 0.1 and 10 wt %, in relation to total weight of the composition.

The composition prepared by utilization according to the invention can in addition contain a pharmaceutical, dermatological or cosmetically acceptable excipient. One can utilize any excipient adapted for galenic forms known to one skilled in the art, for topical, oral, enteral or parenteral, and in particular rectal administration.

In particular, this excipient may be adapted to obtain a composition in the form of an oily solution, a water-in-oil emulsion an oil-in-water emulsion, a microemulsion, an oily gel, an anhydrous gel, a cream, a dispersion of droplets, of microcapsules or microparticles, or again gels, or soft gelatinous or vegetable capsules.

Preferably, an excipient adapted for topical or rectal administration is utilized.

The advantageous effect of inhibiting the activity of 5 $\alpha$ -reductase provided, according to the invention, allows one to tailor the composition thus prepared for therapeutic treatments, in particular dermatological, and cosmetic.

Utilization according to the invention is thus characterized in that the composition is intended for the treatment of pathologies and/or skin disorders related to a congenital or acquired exaggeration of the activity of 5 $\alpha$ -reductase.

In particular, utilization according to the invention is characterized in that the composition is intended for treatment of prostatic hypertrophy.

Utilization according to the invention is further characterized in that the composition is intended for treatment of prostatic adenoma.

Utilization according to the invention is also characterized in that the composition is intended for treatment of acne.

Utilization according to the invention is also characterized in that the composition is intended for treatment of hyperseborrhea

Finally, utilization according to the invention is also characterized in that the composition is intended for treatment of alopecia.

Utilization according to the invention is also characterized in that the composition is intended for treatment of hirsutism.

An object of the present invention is also a cosmetic treatment method for oily skin, characterized in that one applies to the skin a cosmetic composition containing at least one product selected from the group containing isoflavones, extracts from the African plum tree and mixtures thereof such as described above.

The invention moreover has as its object a cosmetic treatment method for loss of hair, characterized in that one applies to the scalp a cosmetic preparation containing at least one product selected from the group comprising the isoflavones, extracts of the African plum tree and mixtures thereof as described above.

Finally the invention likewise has the object a cosmetic treatment method for excessive hairiness, characterized in that to areas of the skin that have excessive hairiness one applies a cosmetic preparation containing at least one product selected from the group comprising the isoflavones, extracts of the African plum tree and mixture thereof, such as described above.

In fact, in contrast to hormonal medical treatments, the last two cosmetic treatment methods allow one to improve one's appearance by visibly decreasing the unsightly phenomena of hair loss related to alopecia and the phenomena of excess hairiness related to hirsutism.

According to the preferred use of these cosmetic treatment methods, the product is present in the preparations according to proportions between about 0.001 and about 100 by weight (utilized in the pure state if possible, without excipient), and preferably between about 0.1 and 10 wt % in relation to total weight of the preparation.

Advantageously, the cosmetic preparation applied according to the cosmetic method of the invention additionally contains at least one cosmetically acceptable excipient such as described above.

Finally, the invention has another purpose, the utilization of at least one compound selected from the group comprising the isoflavones, extracts from the African plum tree and mixtures thereof as described above, as an additive to human or animal food. This food use is characterized preferably in that the additive is present in the food in a proportion between about 0.001 and about 100 wt %, preferably between about 0.01 and about 70 wt %, and more particularly between about 0.1 and 10 wt %, in relation to the total weight of the food.

The following examples are intended to illustrate the present invention and must not in any case be interpreted as limiting its scope.

Unless otherwise indicated the percentages indicated are the percentages by weight.

**Example 1: Evaluation of the Inhibiting Activity of 5 $\alpha$ -Reductase Activity by Measuring the Quantity of 5-Dihydrotestosterone Formed from Testosterone by DU145 Cells.**

**1. Material and Methods**

**1.1 Material**

Prostatic DU145 cells are products of a tumor line obtained from a prostate carcinoma (No. ATCC HTB 81). The MEM medium (ref. 0410265), the glutamin and the gentamycin are from Gibco, The fetal calf serum (SVF) comes from DAP and is utilized uncomplemented (45 mm at 56 °C). The plastic containers for the culture (boxes and slides) come from Costar. The testosterone comes from Sigma.

**1.2 Method**

**1.2.1 Preparation of the Series of Products**

A 10 mg/ml mother solution in ethanol is prepared for each of the products being tested.



The following range of concentrations is utilized for the tests: 0,5, 50, 100 and 500 micrograms/ml. (Dilution carried out in the culture medium). The volume of extract added per dish being 20 micrometers/dish. The prepared solutions are concentrated 50x.

### **Preparation of the Testosterone**

A mother solution of 10 mM testosterone is prepared in ethanol. At the moment of its use, this solution is diluted to 1:1000 in the culture medium and 10 microliters are added per dish.

### **1.2.2 Inhibition Test of DU145 by 5 $\alpha$ -Reductase**

The DU145 prostate cells are cultivated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in an MEM medium containing glutamine (2 mM), gentamycin (50 micrograms/ml) and 10% SVF, The sub-culture level is 1:10.

Before starting the test, the cells are put into the culture in the slides, 6 dishes amounting to 2 x 10<sup>5</sup> DU145 per dish/1 ml of medium containing only 1% of SVF. The cells are kept for 3 days at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. The day of the test, the culture medium contained in the dish is replaced by new medium containing 1% of SVF testosterone (0.1 micromolar final) and the extracts are added at different concentrations to the medium in the amount of 10 to 20 microliters per dish, respectively. (The control dishes correspond to cells incubated in the presence of testosterone and an equivalent amount of ethanol. This permits one to subtract the effect of the solvent on the cultures and to determine the percentage of DHT formed in the absence of the inhibitor). The cells are then incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. At the end of 3 hours, the supernatant culture is collected and frozen at - 80 °C until dosing is carried out.

### **Determination of Amount of DHT Formed**

Principle: extraction of lipophilic product with ether, concentration of the samples in DHT by affinitive chromatography and radio-immunoassay.

#### Preparation of the Samples

- After having rotary agitation the samples are introduced into SEPEX flasks
- To each solution is then added 0.1 ml of the radioactive solution "3H-Rdt" (for evaluation of the extraction yield).The flasks are stoppered and re-agitated one by one in the rotary agitator.
- Let stand for 30 minutes at room temperature, then agitate each flask again in the rotary agitator.
- Add 5 ml of ethyl ether to each flask.
- Stopper the flasks and agitate them manually, but energetically.

- Let stand for several minutes.
- Freeze the aqueous phases at -30 °C for at least 1 hour.
- Collect the ethereal phase in a 5 ml borosilicate test tube
- Totally evaporate the ether phase using a water bath evaporator at 37 °C.

#### Separation of the DHT

- Preparation of the columns: Prepare the columns in 5 ml glass culture pipettes with 10 cm of chromatolite A
  - Rinsing of the columns: 3 times with 3 ml of pure isooctane combitips with simple gravity flow.
  - Elution of the dry ethereal extract.
- To each dry extract is added 1 ml of pure isooctane and is stirred vigorously. Let stand for 15 minutes at ambient temperature. Restir using rotary agitator.
  - After the 3 ml of isooctane has been eluted, (washing of the column) decant the dry ether extract to which the isooctane was added. Allow it to elute.
  - Rinse each tube "extra dry" with 1 ml of pure isooctane combitips (*translator: word combitips not found in dictionary*), agitate vigorously using the rotary agitator. Let stand for 15 minutes at ambient temperature. Agitate again using the rotary stirrer.
  - Wash with 4 ml of pure isooctane.
- Collection of the DHT
- Prepare the elution solvent (mixture of 6% isooctane/diethyl acetate: 94/6 (v-v)).
  - Elute with 6 ml (pipette) of this mixture.
  - Recover the DHT washings in the 5 ml borosilicate test tubes.
  - Treatment of the DHT washings: Evaporate the eluant solvent using the water bath evaporating system (37 °C).

#### RIA Dosage

- Distribution protocol: Dissolve the samples in 0.15 ml of RC buffer, the blank with 1 ml of RC buffer, the controls in 0.5 ml of RC buffer. Place in the oven at 37 °C for 15 minutes. Agitate the tubes again for 1 minute after removing from the oven.

Put into the 5 ml glass hemolysis tubes in the following order:

- \* **Buffer.** Total Activity (AT): 0.7 ml of RC buffer, Non Specific Activity (N): 0.2 ml of RC buffer, Series: only point 0 in the series (designated B0) has 0.1 ml of RC buffer,
- \* **Standard solution** (1000 at 7.8 pg/tube): 0.1 ml of the respective standard solution.
- \* 0.1 ml of the extract dissolved in the buffer
- Then, distribute the **anti-serum**: 0.1 ml in all the tubes except AT and N.
- Then distribute the **“3HD” dosing solution**: 0.1 ml in all the tubes.
- Stir with the rotary agitator and cover with a parafilm.
- Incubate at 4 °C for 1 h 30 min (24 h maximum).
- Preparation of carbon-dextran: Put the carbon-dextran suspension into a beaker, then into an ice bath at 4 °C, for at least 1 h 30 min.
- Yield of DHT purification
- Into 6 small scintillation vials (3 per series) place : 0.4 ml of RC buffer + 0.1 ml of “3H-Rdt” solution (flask in refrigerator from day 1 ). Blanks: put 0.5 ml of reconstituted dry extract for the blank. Samples and controls: put together 0.25 ml of RC buffer + 0.25 ml of the extract.
- Add 5 ml of scintillation liquid to all of the vials.

#### Separation of the free DHT from that bound to the antibody

- Place the magnetically stirred carbon-dextran suspension into an ice bath
- Agitate using the rotary agitator, put the tubes back into the ice bath. Wait exactly 10 minutes.
- Centrifuge at 4 °C, 3400 rpm for 11 min
- Pipette 0.5 ml of each supernatant (including AT) into a small graduated vial
- Add 5 ml of scintillation liquid. Agitate, Let equilibrate for 30 min at ambient temperature.
- Place in the counter for 2 min with the  $\beta$  (Beckman LS 6000 SE)

## 2. Analytical Product Test Results

2.1 The isoflavones soybean extracts tested, denominated Genosten 4000 were furnished by the Nutrinov firm.

**Description:** Soluble soybean extract enriched in isoflavones obtained by a physical extraction technique, using organic solvents.

#### **Physicochemical Characteristics:**

Density	400 g/l
Humidity	< 5%
pH (aqueous 4% solution)	8
Solubility in water	100%

***Composition:***

Proteins	11%
Lipids	<0.5%
Carbohydrates	60%
Sodium	1500 mg/100g
Calcium	< 100 mg/100g
Potassium	5500 mg/100g
Phosphorus	300 mg/100g

***Isoflavone Composition:***

Total isoflavones:	4000 ± 200 mg/100g
Standard profile:	
Daidzin	200
Genistin	280
Malonyldaidzin	900
Malonylgenistin	2080
Daidzin	30
Genistin	10

2.2 Extract of *Pygeum Africanum* tested was furnished by the firm Euromed.

**Description:** Lipido-sterolic extract of *Pygeum Africanum* produced from *Pygeum* bark.

***Physicochemical Characteristics:***

Appearance	Viscous maroon colored pâte, with a characteristic odor
Solubility	Insoluble in water, soluble in chloroform
Loss on drying	3% max.
Ash content	0.4% max
UV Absorption	Maxima at 242; 282 and 320 nm

***Chemical Composition***

Acidity index	39 mg KOH/g
---------------	-------------

Fatty Acids (%)

C12:0	0.3
C16:0	44.6
C18:0	5.6
C18:1	36.6
C18:2	9.8
C18.3	0.6
Non-saponifiable content	17.6%
Sterols	14.7

**3. Results - Evaluation of Conversion of Testosterone to 5-Dihydroxytestosterone by DU145 Cells - IC 50 Determination**

**Table 4**

<b><u>Product Tested</u></b>	<b><u>IC 50 (<math>\mu</math>g/ml)</u></b>
Isoflavone extracted from soybeans (Genosten 4000)	71
Extract from Pygeum Africanum	203
Serenoa Repens	60

**4. Conclusions**

The extract from Serenoa Repens, chosen as a reference substance inhibits the activity of  $5\alpha$ -reductase. This result serves therefore to validate the test.

The isoflavone extract from soybeans, having a small isoflavone content (4%) is as active as that extracted from Serenoa Repens, chosen as reference substance for inhibiting the activity of  $5\alpha$ -reductase. The extract from Pygeum Africanum tested is active as a  $5\alpha$ -reductase inhibitor.

**Example 2: Evaluation In 3HD Vitro of 5 $\alpha$ -Reductase Activity for Conversion of Testosterone into 5 $\alpha$ -Dihydroxytestosterone in Normal Human Dermal Fibroblast Cultures.**

**Abbreviations utilized in the following:**

$^3\text{H}$	Tritium
CCM	Thin layer chromatography
Ci	Curie
DMSO	Dimethyl sulfoxide
M199	Name given to a standard culture
MCF	Fibroblast culture medium
MEM	Name given to the culture, <i>Minimum Essential Medium</i>
MIF	Fibroblast incubation medium
Rf	Relative retention factor
SVF	Fetal calf serum
5 $\alpha$ -DHT	5 $\alpha$ -dihydroxytestosterone

It is proposed to evaluate the effect on 5 $\alpha$ -reductase activity of products such as a soybean isoflavone extract (Genosten 4000, described below), genistein, genistin (purified isoflavones, commercial products from Sigma) an extract from *Pygeum Africanum*, an extract from *Serenoa Repens* selected as a reference. An *in vitro* model of normal human dermal fibroblast cultures has been employed.

## **1. Materials and Methods**

### **1.1 Test Products, Reference Product, and Reagents**

The products for testing have been furnished by EXPANSCIENCE and have been maintained at + 4 °C up to the time of their use.

The radioactively labeled testosterone (labeled with tritium in positions 1, 2, 6 and 7, having a specific activity of 79 Ci/mmol) was furnished by AMERSHAM, the unlabeled testosterone was furnished by Sigma.

The analytical grade reagents came from SIGMA, MERCK, BDH, ALDRICH or CARLO ELBA, unless otherwise indicated.

### **1.2 Test System**

The fibroblast culture medium (MCF) consisted of MEM/M199 (3:1, v/v) with additions of penicillin (50 UI/ml), streptomycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ), sodium bicarbonate (0.2%, p/v) and SVF (10%, v/v).



After the incubation period, the cells have been submitted to ultrasound in the MIF medium., The cellular lysates thus obtained have been extracted using dichloromethane. After evaporation, the dry residues have been dissolved in methanol and have been deposited on silica slides 60F<sub>254</sub> (MERCK, reference 5554).

Non radioisotope-labeled standards, testosterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and androstenedione have been deposited on each of the slides.

The migration solvent was a mixture of dichloromethane and ether (7:3, v/v). At the end of the migration the silica slides have been read using a radioactivity scanner (BERTHOLD).

The non radioisotope-labeled standards were treated by spraying 5% sulfuric acid onto the chromatographic slides and subsequently heating them to 100 °C for 10 minutes.

Comparison of the R<sub>f</sub> (relative retention factor) values determined for the standards with those obtained for the different radioactive metabolites permitted identification of the latter.

The metabolism of testosterone to 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone has been calculated under the different experimental conditions: the results (peak areas from 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone counted by the BERTHOLD scanner) have been expressed in pmoles of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone formed for each culture dish. They have also been expressed as percentage of the 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone activity present in the "DMSO comparison" group.

## **2.5 Treatment of the Results**

The groups of results (control groups and treated groups) have been treated by means of an analysis of the single factor variance (ANOVA 1, p<0.05) followed by a DUNNETT test (p<0.05). The effect of the test products and the reference product have been compared to the "DMSO comparison". The effect of the test products and the reference product have been compared between themselves by means of an analysis of the variance to two factors (ANOVA 2, p<0.05, factor 1 = concentration and factor 2 = treatment).

## **2. Results and Discussion**

The detailed results are reported in paragraph 3, below.

### **2.1 Genistin and Genistein**



In the samples "comparison DMSO" (0.1% v/v), the rate of metabolism of testosterone was  $11.40 \pm 0.75$  pmoles of  $5\alpha$ -DHT formed in 24 hours in each culture dish (see table in paragraph 3.1). This rate was in agreement with previously obtained laboratory results.

Genistin, tested at 0.1; 1 and 10  $\mu\text{g/ml}$ , significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) by 32% the activity of  $5\alpha$ -reductase. At 100  $\mu\text{g/ml}$ , it significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) by 32% the activity of  $5\alpha$ -reductase.

Genistin, tested at 0.1; 1 and 10  $\mu\text{g/ml}$ , significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) by 32%; 33% and 31% respectively the activity of  $5\alpha$ -reductase. At 100  $\mu\text{g/ml}$ , it significantly inhibited the  $5\alpha$ -reductase activity, by 61%.

In conclusion, Genistein is distinctly more active than Genistin.

## **2.2 Extract of Soybean Isoflavones**

In the comparison cultures the rate of testosterone metabolism was  $9.71 \pm 0.77$  moles of  $5\alpha$ -DHT formed in 22 hours per culture dish (see Table in paragraph 3.2). This rate is consistent with results obtained previously in the laboratory.

The soybean isoflavone extracts tested at 10 and 100  $\mu\text{g/ml}$ , inhibited the activity of  $5\alpha$ -reductase by 22 and 17% respectively.

The extract of *Serenoa Repens* tested at 10 and 100  $\mu\text{g/ml}$  inhibited the activity of  $5\alpha$ -reductase by 15 and 35%, respectively. At 1  $\mu\text{g/ml}$  it did not have any effect.

In conclusion, under the different experimental conditions, the soybean isoflavone extracts of *Serenoa Repens* (reference) inhibited the activity of  $5\alpha$ -reductase. The isoflavone extracts from soybean had a higher inhibiting activity for  $5\alpha$ -reductase than that of the *Serenoa Repens* extract.

## **2.3 Extract of Pygeum Africanum**

In the comparison cultures the rate of metabolism of testosterone was  $9.71 \pm 0.77$  moles of  $5\alpha$ -DHT formed in 22 hours per culture dish (see Table in paragraph 3.3). This rate is consistent with results obtained previously in the laboratory.

The effects of the test products have been compared to those obtained in presence of finasteride, utilized as a reference product, as well as the extract of *Serenoa Repens*.

The finasteride, tested at 3 and 30 ng/ml inhibited the activity of 5 $\alpha$ -reductase by 36 and 65% respectively (Table 1). This result was anticipated and serves validates the study.

The extract of *Serenoa Repens*, tested at 10 and 100  $\mu$ g/ml inhibited the activity of 5 $\alpha$ -reductase by 15 and 35% respectively. At 1  $\mu$ g/ml, it had no effect (Table 2).

The extract of *Pygeum Africanum*, tested at 1, 10 and 100  $\mu$ g/ml inhibited the activity of 5 $\alpha$ -reductase by 33, 22 and 30% respectively (Table 2).

In conclusion, the extracts of *Serenoa Repens* and *Pygeum Africanum* inhibited the activity of 5 $\alpha$ -reductase in an almost identical fashion.

### 3. Detailed Tables of Results

#### 3.1 Effect of Genistin and Genistein on Activity of 5 $\alpha$ -Reductase in Normal Human Fibroblast Cultures, after 24 hours Incubation

Product	DMSO	Concentration ( $\mu$ g/ml)			
	1% (v/v)	0.1	1	10	100
<b>Genistin</b>	10.56	11.72	9.80	13.64	7.12
	12,00	11.16	9.88	14.12	8.84
	11.64	9.36	10.16	12.64	7.20
	<b>11.40 <math>\pm</math> 0.75</b>	<b>10.75 <math>\pm</math> 1.23</b>	<b>9.95 <math>\pm</math> 0.19</b>	<b>13.47* <math>\pm</math> 0.76</b>	<b>7.72* <math>\pm</math> 0.97</b>
	<i>100</i>	<i>94</i>	<i>87</i>	<i>118</i>	<i>68</i>
<b>Genistin</b>	10.56	8.04	7.52	7.96	4.24
	12,00	7.52	8.56	8.68	4.96
	11.64	7.72	7.00	6.88	4.16
	<b>11.40 <math>\pm</math> 0.75</b>	<b>7.76* <math>\pm</math> 0.26</b>	<b>7.69* <math>\pm</math> 0.79</b>	<b>7.84* <math>\pm</math> 0.91</b>	<b>4.45* <math>\pm</math> 0.44</b>
	<i>100</i>	<i>68</i>	<i>67</i>	<i>69</i>	<i>39</i>

The results are expressed in pmoles of 5 $\alpha$ -DHT formed per culture dish

In bold: average and deviation

In italics: percentage of the group "DMSO 0.1% (v/v)"

\* : Average significantly different from the group "DMSO 0.1% (v/v)"

**3.2 Effect of Extracts of *Serenoa Repens* and Soybean Isoflavones (Genosten 4000) on the Activity of 5 $\alpha$ -Reductase in Normal Human Fibroblast Cultures, after 22 Hours Incubation**

Product	DMSO	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	1% (v/v)	1	10	100
<b><i>Serenoa Repens</i></b>	8.00	7.72	6.84	5.48
	8.92	9.20	7.48	5.68
	8.68	8.08	7.52	5.44
	<b>8.53 <math>\pm</math> 0.48</b>	<b>8.33 <math>\pm</math> 0.77</b>	<b>7.28* <math>\pm</math> 0.38</b>	<b>5.53* <math>\pm</math> 0.13</b>
	<i>100</i>	<i>98</i>	<i>85</i>	<i>65</i>
<b>Isoflavone Extract from Soybean (Genosten 4000)</b>	8.00		6.24	7.04
	8.92		6.52	7.12
	8.68		7.12	7.12
	<b>8.53 <math>\pm</math> 0.48</b>		<b>6.63* <math>\pm</math> 0.45</b>	<b>7.09* <math>\pm</math> 0.05</b>
	<i>100</i>		<i>78</i>	<i>83</i>

The results are expressed in pmoles of 5 $\alpha$ -DHT formed per culture dish

In bold: average and deviation

In italics: percentage of the group "DMSO 0.1% (v/v)"

\* : Average significantly different from the group DMSO ( $p < 0.05$ )

**3.3 Effect of Finasteride and the Extracts of *Serenoa Repens* and *Pygeum Africanum* on the Activity of 5 $\alpha$ -Reductase in Normal Human Fibroblast Cultures, after 22 Hours Incubation**

**3.3.1 Finasteride**

Control	DMSO	Finasteride (ng/ml)	
	1% (v/v)	3	30
9.24	8.00	5.52	2.92
9.28	8.92	5.84	2.92
10.60	8.68	5.00	3.00
<b>0.71 <math>\pm</math> 0.77</b>	<b>8.53 <math>\pm</math> 0.48</b>	<b>5.45* <math>\pm</math> 0.42</b>	<b>2.95* <math>\pm</math> 0.05</b>
<i>114</i>	<i>100</i>	<i>64</i>	<i>35</i>

The results are expressed in pmoles of 5 $\alpha$ -DHT formed per culture dish  
 In bold: average and deviation  
 In italics: percentage of the group "DMSO 0.1% (v/v)"  
 \* : Average significantly different from the group DMSO (p<0.05)

### 3.3.2 Extracts of *Serenoa Repens* and *Pygeum Africanum*

Product	DMSO	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	1% (v/v)	1	10	100
<i>Serenoa Repens</i>	8.00	7.72	6.84	5.48
	8.92	9.20	7.48	5.68
	8.68	8.08	7.52	5.44
	<b>8.53 <math>\pm</math> 0.48</b>	<b>8.33 <math>\pm</math> 0.77</b>	<b>7.28* <math>\pm</math> 0.38</b>	<b>5.53* <math>\pm</math> 0.13</b>
	<i>100</i>	<i>98</i>	<i>85</i>	<i>65</i>
<i>Pygeum Africanum</i>	8.00	5.00	6.36	5.84
	8.92	5.64	7.28	6.52
	8.68	6.40	6.20	5.60
	<b>8.53 <math>\pm</math> 0.48</b>	<b>5.68 <math>\pm</math> 0.70</b>	<b>6.61 <math>\pm</math> 0.58</b>	<b>5.99 <math>\pm</math> 0.48</b>
	<i>100</i>	<i>67</i>	<i>78</i>	<i>70</i>

The results are expressed in pmoles of 5 $\alpha$ -DHT formed per culture dish  
 In bold: average and deviation  
 In italics: percentage of the DMSO group  
 \* : Average significantly different from the DMSO group (p<0.05)

### Example 3: Composition of a Shampoo for Oily Hair

	%
Water	to 100.000
Sodium Lauroamphoacetate	14.000
Coco-Glucoside	10.000
Magnesium Laureth Sulfate	5.000
PEG-40 Glyceryl Cocoate	3.450
PEG-150 Distearate	1.850
Sodium Cocyl Sulfate	1.050
Citric Acid	0.450
Disodium EDTA	0.300
Perfume	0.200
Methylparaben	0.160
Butylparaben	0.060
Soybean Isoflavone	1,000

Pygeum Africanum	0.500
------------------	-------

**Example 4: Composition of an Emulsion for Oily Skin**

	%
Water	to 100.000
Di-C <sub>12-13</sub> Alkyl Maleate	10.000
Glycerine	5.000
PEG-5 Glyceryl Stearate	3.500
Glyceryl Stearate	1.500
Ceresin	1.500
PEG-40 Stearate	1.500
Sorbitan Stearate	1.000
Zinc PCA	1.000
Cetyl Alcohol	1.000
Polyacrylamide	1.000
C <sub>13-14</sub> Isoparaffin	0.500
Perfume	0.500
Piroctone Olamine	0.300
Laureth-7	0.125
Sodium Polyacrylate	0.065
Citrate of Hydrogenated Palm Glycerides	0.040
Soybean Isoflavone	2.000

**Example 5: Composition of an Emulsion for Oily Skin**

	%
Water	to 100
Di-C <sub>12-13</sub> Alkyl Maleate	10.000
Glycerin	5.000
PEG-5 Glyceryl Stearate	3.500
Ceresin	1.500
PEG-40 Steerage	1.500
Sorbitan Stearate	1.000
Zinc PCA	1.000
Cetyl Alcohol	1.000
Polyacrylamide	1.000
C <sub>13-14</sub> Isoparaffin	0.500
Perfume	0.500
Piroctone Olamine	0.300
Laureth-7	0.125
Sodium Polyacrylate	0.065
Citrate of Hydrogenated Palm Glycerides	0.040

Pygeum Africanum	1.000
Salicylic Acid	1.000
<i>Translator: words "laureth" and "coceth" not found in dictionary</i>	

### Claims

1. Utilization of at least one product from the group consisting of the isoflavones, extracts from the African plum tree and mixtures of thereof, for preparation of a composition aimed at inhibiting the activity of 5 $\alpha$ -reductase.
2. Utilization according to claim 1, characterized in that the composition is aimed at inhibiting Type 1 and/or Type 2 isoenzyme of 5 $\alpha$ -reductase.
3. Utilization according to claim 1 or claim 2, characterized in that the product is selected from synthetic or naturally occurring isoflavones.
4. Utilization according to any of the preceding claims, characterized in that the product is selected from synthetic or naturally occurring isoflavones from the group consisting of genistin, daidzin, glycitin, acetylaidzin, acetylgenistin, acetylglycitin, malonyldaidzin, manolgenistin, manolyglycitin, 2,4,4'-trihydroxy deoxybenzoin (THB), daidzin, genistin, glycitein, formononectin, biochanin A, genistin-4-0-glycoside, 2'-hydroxygenistein-7-0-glycoside, genistein-C-8-glycoside, and mixtures thereof.
5. Utilization according to any of the preceding claims, characterized in that the product is selected from the group consisting of genistin, genistin and mixtures thereof.
6. Utilization according to any of the preceding claims, characterized in that the product is selected from the isoflavone extracts of soybeans.
7. Utilization according to any of the preceding claims, characterized in that the product is selected from the isoflavone extracts of lupin.
8. Utilization according to any of the preceding claims, characterized in that the product is utilized in a proportion between 0.001 and about 100% by weight, in relation to the total weight of the composition.
9. Utilization according to any of the preceding claims, characterized in that the composition contains a pharmaceutical, dermatologically or cosmetically acceptable excipient.
10. Utilization according to claim 9, characterized in that the excipient is suitable for external topical application or rectal application.

11. Utilization according to any of the preceding claims, characterized in that the composition is intended for treatment of pathologies and/or skin disorders related to a congenital or acquired exaggeration of 5 $\alpha$ -reductase activity.

12. Utilization according to any of claims 1 to 10, characterized in that the composition is intended for treatment of prostatic hypertrophy.

13. Utilization according to any of claims 1 to 10, characterized in that the composition is intended for treatment of prostatic adenoma.

14. Utilization according to any of claims 1 to 10, characterized in that the composition is intended for treatment of acne.

15. Utilization according to any of claims 1 to 10, characterized in that the composition is intended for treatment of hyperseborrhea.

16. Utilization according to any of claims 1 to 10, characterized in that the composition is intended for treatment of alopecia.

17. Utilization according to any of claims 1 to 10, characterized in that the composition is intended for treatment of hirsutism.

18. Cosmetic treatment method for oily skin, characterized in that one applies a cosmetic composition containing at least one product such as defined in any of claims 1, and 3 to 7.

19. Cosmetic treatment method for hair loss, characterized in that one applies to the scalp a cosmetic composition containing at least one product such as defined in any of claims 1, and 3 to 7.

20. Cosmetic treatment method for excess hairiness, characterized in that one applies to areas of the skin having excess hairiness a cosmetic composition containing at least one product such as defined in any of claims 1, and 3 to 7.

21. Cosmetic treatment method according to any of claims 18 to 20, characterized in that the product is present in the composition in a proportion between about 0.001 and about 100% by weight, in relation to the total weight of the composition.

22. Method according to any of claims 18 to 21, characterized in that the cosmetic composition additionally contains at least one cosmetically acceptable excipient.

23. Utilization of at least one product such as defined by any of claims 1, and 3 to 7, as an additive in human or animal food.

24. Utilization according to claim 23, characterized in that the product is present in the food in the proportion of about 0.001 to about 100% by weight, in relation to the total weight of the food.

FRANCE

**INPI**

National Institute  
of Industrial Property

REPORT OF PRELIMINARY

PARTIAL RESEARCH  
established based on the  
latest claims filed before  
the research began  
SEE ADDITIONAL PAGES

2803747

National Registration No.

FA 583255  
FR 0000573

DOCUMENTS CONSIDERED PERTINENT	Claims	INPI Classification
Category Document Cited if needed, with pertinent parts		
X WO 99 22728 A (ARCH DEV CORP; LIAO SHUTSUNG (US); HIIPAKA RICHARD A (US)) May 14, 1999 * page 2, line 25 - page 3 line 30* *claims 1-7* Table 1, (compounds 10, 17) Table 7, (compounds 23, 31) *page 10, line 1 - page 15, line 26* *page 21, line 31 - page 22, line 4*	1-5, 8-24	A61K7/48 A61K7/06 A61K35/78 A61K31/353 A61P17/08 A61P17/14 A61P17/10
X JP 10 059995 A (FUJIMOTO BROS:KK) Mar 3 1998  *summary*	1-3, 8-15, 18 21-24	
X DATABASE WPI Derwent Publications Ltd. London, GB AN 1990-278125 XP002149039 "5-Alfa reductase inhibitors contg. isoflavone cpd." & JP 02 193920 A (KAO CORPORATION) *summary*	1-3, 8, 9, 11, 14-18 21-24	TECHNICAL AREAS <u>RESEARCHED (Int Cl<sup>7</sup>)</u>  A61K
X US 5,543,146 A (PEREZ CARLOS) Aug 6, 1996  *column 2, line 11-16* *column 3, line 22-28* *claims; examples*	1-3, 8-10, 12, 13, 22-24,	



---

X US 5,972,346 A (CHIZICK STEPHEN ET AL) 1-3,  
Oct 26 1999 8-11, 16,  
19, 21-24

\* column 2, line 19-40, claims\*

page 1 of 2

---

X DATABASE WPI 1-3,  
Derwent Publications Ltd., London, GB; 8-11, 16,  
AN 1986-129442 19, 21-24  
XP002149040

"Hair tonic preparation showing hair-  
growing effects containing extract bark  
prunus africana."  
& JP 61 068408 A (POLA KASEY KOGYO KK),  
1986

\*summary\*

*translator's note:  
claims are same  
as in previously  
cited patent.*

---

P,X SHMIZU KUNIYOSHI ET AL: 1-3, 8, 9,  
"The 5.alpha.-reductase inhibitory components 12-26,  
from heartwood of Artocarpus incisus. 19-22  
Structure-activity investigations".

PLANTA MED. (2000), 66(1), 16-19,  
XP000951500

\*the entire document\*

---

Date research was completed  
Oct 3, 2000

Examiner  
Veronese, A

---

CATEGORY OF DOCUMENTS CITED

*(translator's note: only categories mentioned were X and P)*

X: particularly pertinent by itself

P: interpolated document

---

page 2 of 2

2803747

Application  
Number

**RESEARCH INCOMPLETE  
SUPPLEMENTARY SHEET C**

FA 583255  
FR 0000573

Certain claims did not fulfill the research objective or are incomplete:

Claims which incompletely satisfied the research objective:

1-24

Reason:

The definitions "isoflavones and "plum tree of Africa" given in claim 1 refer to a very large variety of compounds/products. Nevertheless a foundation and/or an account can only be found for a very restricted number of the compounds/products that are claimed. In the present case the claims are lacking so fundamentally, and the description of the invention is so limited that significant research covering the total spectrum claimed is impossible. As a result, the research has been limited to those parts of the claims that provide a fundamental exposition, that is to say the parts referring to the compounds mentioned in claim 4, in the descriptions on pages 5-6 and to extracts of the African plum tree named "Pygeum" and Prunus Africana".

The definition "composition aimed at inhibiting the activity of the 5 alfa reductase" given in claim 1 doesn't specify the disorders for which the compositions are intended. As a result, the research has been restricted to the disorders mentioned in claims 12-20.